

**VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT
DEM GEBIET DES PATENTWESES**

PCT

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

(Artikel 18 sowie Regeln 43 und 44 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts 18657P WO	WEITERES VORGEHEN	siehe Mitteilung über die Übermittlung des internationalen Recherchenberichts (Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit zutreffend, nachstehender Punkt 5
Internationales Aktenzeichen PCT/EP 99/ 08211	Internationales Anmelde datum (Tag/Monat/Jahr) 29/10/1999	(Frühestes) Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 30/10/1998

Anmelder

ROCHE DIAGNOSTICS GMBH et al.

Dieser internationale Recherchenbericht wurde von der Internationalen Recherchenbehörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 18 übermittelt. Eine Kopie wird dem Internationalen Büro übermittelt.

Dieser internationale Recherchenbericht umfaßt insgesamt **4** Blätter.

Darüber hinaus liegt ihm jeweils eine Kopie der in diesem Bericht genannten Unterlagen zum Stand der Technik bei.

1. Grundlage des Berichts

a. Hinsichtlich der **Sprache** ist die internationale Recherche auf der Grundlage der internationalen Anmeldung in der Sprache durchgeführt worden, in der sie eingereicht wurde, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

Die internationale Recherche ist auf der Grundlage einer bei der Behörde eingereichten Übersetzung der internationalen Anmeldung (Regel 23.1 b)) durchgeführt worden.

b. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale Recherche auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das

in der internationalen Anmeldung in Schriftlicher Form enthalten ist.

zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.

bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.

Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfaßten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

2. **Bestimmte Ansprüche haben sich als nicht recherchierbar erwiesen** (siehe Feld I).

3. **Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung** (siehe Feld II).

4. Hinsichtlich der Bezeichnung der Erfindung

wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

wurde der Wortlaut von der Behörde wie folgt festgesetzt:

5. Hinsichtlich der Zusammenfassung

wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

wurde der Wortlaut nach Regel 38.2b) in der in Feld III angegebenen Fassung von der Behörde festgesetzt. Der Anmelder kann der Behörde innerhalb eines Monats nach dem Datum der Absendung dieses internationalen Recherchenberichts eine Stellungnahme vorlegen.

6. Folgende Abbildung der Zeichnungen ist mit der Zusammenfassung zu veröffentlichen: Abb. Nr. **---**

wie vom Anmelder vorgeschlagen

weil der Anmelder selbst keine Abbildung vorgeschlagen hat.

weil diese Abbildung die Erfindung besser kennzeichnet.

keine der Abb.

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie ^o	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	EP 0 516 540 A (CIS BIO INT) 2. Dezember 1992 (1992-12-02) Seite 3, Zeile 9 - Zeile 48; Ansprüche 1-4 ---	1-10, 18-21
X	EP 0 839 917 A (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH) 6. Mai 1998 (1998-05-06) in der Anmeldung erwähnt Seite 4, Zeile 7 - Zeile 14 ---	1-10, 18-21
X	EP 0 806 484 A (PASTEUR INSTITUT ;INST NAT SANTE RECH MED (FR)) 12. November 1997 (1997-11-12) Seite 4-6 ---	1-10, 18-21
P,X	EP 0 887 427 A (ORTHO CLINICAL DIAGNOSTICS INC) 30. Dezember 1998 (1998-12-30) in der Anmeldung erwähnt Seite 9, Zeile 28 - Zeile 46 ---	1-10, 18-21
P,X	WO 98 58086 A (ABBOTT LAB) 23. Dezember 1998 (1998-12-23) Seite 11, Zeile 21 -Seite 22 ---	1-10, 18-21
P,X	WO 99 07898 A (JURRIAANS SUZANNE ;AKZO NOBEL NV (NL); GOUDSMIT JAAP (NL); LUKASHO) 18. Februar 1999 (1999-02-18) in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument ---	1-10, 18-21
X	WO 98 44945 A (IMMUNE RESPONSE CORP INC) 15. Oktober 1998 (1998-10-15) Application SEQ ID NO 4 has 100% identity in 36 bp overlap with SEQ ID NO 1 ---	13
X	EMBL Database Entry AGPROTF3, Accession number M24551, 6 July 1989: Louis jm et al.: Human immunodeficiency virus (HIV-1) synthetic protease XP002142699 Application SEQ ID NO 5 has 100% identity in 58 bp overlap with AGPROTF3. ---	13
X	EP 0 229 701 A (CETUS CORP) 22. Juli 1987 (1987-07-22) Application SEQ ID NO 9 has 100% identity in 41 bp overlap with sequence Sk 34, page 14, line 18. ---	13
X	WO 92 15708 A (AMOCO CORP) 17. September 1992 (1992-09-17) Application SEQ ID NO 10 has 100% identity in 31 bp overlap with SEQ 839 of Table 1. ---	13
		-/-

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

F EP 99/08211

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 95 21912 A (LEARMONT JENNIFER CATHERINE ;CROWE SUZANNE (AU); COOPER DAVID (AU)) 17. August 1995 (1995-08-17) Application SEQ ID NO 17 has 100% identity in 17 bp overlap with SEQ ID NO 623 ---	15
X	WO 96 02557 A (GEN PROBE INC) 1. Februar 1996 (1996-02-01) Application SEQ ID NO 16 and NO 14 have 100% identity in 18 bp overlap with SEQ ID NO 2, and in 14 bp with SEQ ID NO 1 respectively. ---	15
A	DE BAAR M ET AL: "Design and evaluation of a Human Immunodeficiency Virus Type 1." JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, Bd. 37, Nr. 6, - Juni 1999 (1999-06) Seiten 1813-18, XP000923207 -----	

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)			Publication date
EP 0854197	A 22-07-1998	AU 693066	A	18-06-1998	
		BR 9800337	A	29-06-1999	
		CA 2222769	A	17-07-1998	
		CN 1191975	A	02-09-1998	
		CZ 9800149	A	12-08-1998	
		HU 9800053	A	28-08-1998	
		JP 2838084	B	16-12-1998	
		JP 10210990	A	11-08-1998	
		NO 980212	A	20-07-1998	
		PL 324327	A	20-07-1998	
		US 5908743	A	01-06-1999	
EP 0727497	A 21-08-1996	US 5599662	A	04-02-1997	
		CA 2169315	A	18-08-1996	
		JP 8242898	A	24-09-1996	
EP 0617132	A 28-09-1994	AU 686616	B	12-02-1998	
		AU 6551594	A	24-10-1994	
		CA 2159103	A	13-10-1994	
		JP 8508404	T	10-09-1996	
		WO 9423069	A	13-10-1994	
		US 5856088	A	05-01-1999	
		US 5712385	A	27-01-1998	
EP 0516540	A 02-12-1992	FR 2677039	A	04-12-1992	
		DE 69217122	D	13-03-1997	
EP 0839917	A 06-05-1998	DE 19644248	A	30-04-1998	
		JP 10117780	A	12-05-1998	
		US 5985544	A	16-11-1999	
EP 0806484	A 12-11-1997	FR 2647809	A	07-12-1990	
		FR 2652091	A	22-03-1991	
		AT 185379	T	15-10-1999	
		CA 2062829	A	03-12-1990	
		DE 69033311	D	11-11-1999	
		DE 69033311	T	17-02-2000	
		EP 0403333	A	19-12-1990	
		ES 2139567	T	16-02-2000	
		WO 9015066	A	13-12-1990	
		JP 2000093187	A	04-04-2000	
		JP 4507043	T	10-12-1992	
		SG 47868	A	17-04-1998	
		US 5688637	A	18-11-1997	
		US 5786177	A	28-07-1998	
EP 0887427	A 30-12-1998	JP 11069987	A	16-03-1999	
		US 6001558	A	14-12-1999	
WO 9858086	A 23-12-1998	US 5962665	A	05-10-1999	
		EP 0991782	A	12-04-2000	
WO 9907898	A 18-02-1999	AU 9161198	A	01-03-1999	
		EP 1002138	A	24-05-2000	
		ZA 9807091	A	26-02-1999	
WO 9844945	A 15-10-1998	AU 7101798	A	30-10-1998	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Info on patent family members

International Application No

EP 99/08211

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
EP 0229701	A 22-07-1987	AT 127857	T	15-09-1995
		AU 606043	B	31-01-1991
		AU 6710987	A	16-07-1987
		CA 1279244	A	22-01-1991
		DE 3751513	D	19-10-1995
		DE 3751513	T	28-03-1996
		DK 10787	A	11-07-1987
		ES 2078214	T	16-12-1995
		IE 69565	B	02-10-1996
		JP 2576980	B	29-01-1997
		JP 62217161	A	24-09-1987
		JP 2574640	B	22-01-1997
		JP 6233700	A	23-08-1994
		KR 9104250	B	24-06-1991
		NZ 218865	A	29-05-1989
		US 5386022	A	31-01-1995
		US 5594123	A	14-01-1997
		US 5176995	A	05-01-1993
		US 5008182	A	16-04-1991
		ZA 8700152	A	28-09-1988
WO 9215708	A 17-09-1992	EP 0529070	A	03-03-1993
		US 5702896	A	30-12-1997
WO 9521912	A 17-08-1995	US 6010895	A	04-01-2000
		AU 699175	B	26-11-1998
		AU 1700895	A	29-08-1995
		CA 2183154	A	17-08-1995
		EP 0754223	A	22-01-1997
		JP 10500281	T	13-01-1998
		US 6015661	A	18-01-2000
		ZA 9501182	A	18-10-1995
WO 9602557	A 01-02-1996	US 5733781	A	31-03-1998
		AU 699233	B	26-11-1998
		AU 3135495	A	16-02-1996
		CA 2194398	A	01-02-1996
		EP 0697414	A	21-02-1996
		JP 10501421	T	10-02-1998

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 7 C12Q

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

STRAND

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie ³	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	EP 0 854 197 A (HOFFMANN LA ROCHE) 22. Juli 1998 (1998-07-22) Seite 2, Zeile 32 - Zeile 53 Seite 4, Zeile 1 - Zeile 48 ---	1-10, 18-21
X	EP 0 727 497 A (HOFFMANN LA ROCHE) 21. August 1996 (1996-08-21) in der Anmeldung erwähnt Seite 1, Zeile 24 - Zeile 31 Seite 4, Zeile 31 - Seite 5, Zeile 19 ---	1-10, 18-21
X	EP 0 617 132 A (GEN PROBE INC) 28. September 1994 (1994-09-28) in der Anmeldung erwähnt Seite 3, Zeile 9 - Zeile 16 ---	1-10, 18-21

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

³ Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

17. Juli 2000

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

07/08/2000

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Osborne, H

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

From the INTERNATIONAL BUREAU

NOTIFICATION OF ELECTION
(PCT Rule 61.2)

To:

Assistant Commissioner for Patents
 United States Patent and Trademark
 Office
 Box PCT
 Washington, D.C.20231
 ETATS-UNIS D'AMERIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year) 04 July 2000 (04.07.00)	
International application No. PCT/EP99/08211	Applicant's or agent's file reference 18657P WO
International filing date (day/month/year) 29 October 1999 (29.10.99)	Priority date (day/month/year) 30 October 1998 (30.10.98)
Applicant HABERHAUSEN, Gerd et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:

18 April 2000 (18.04.00)

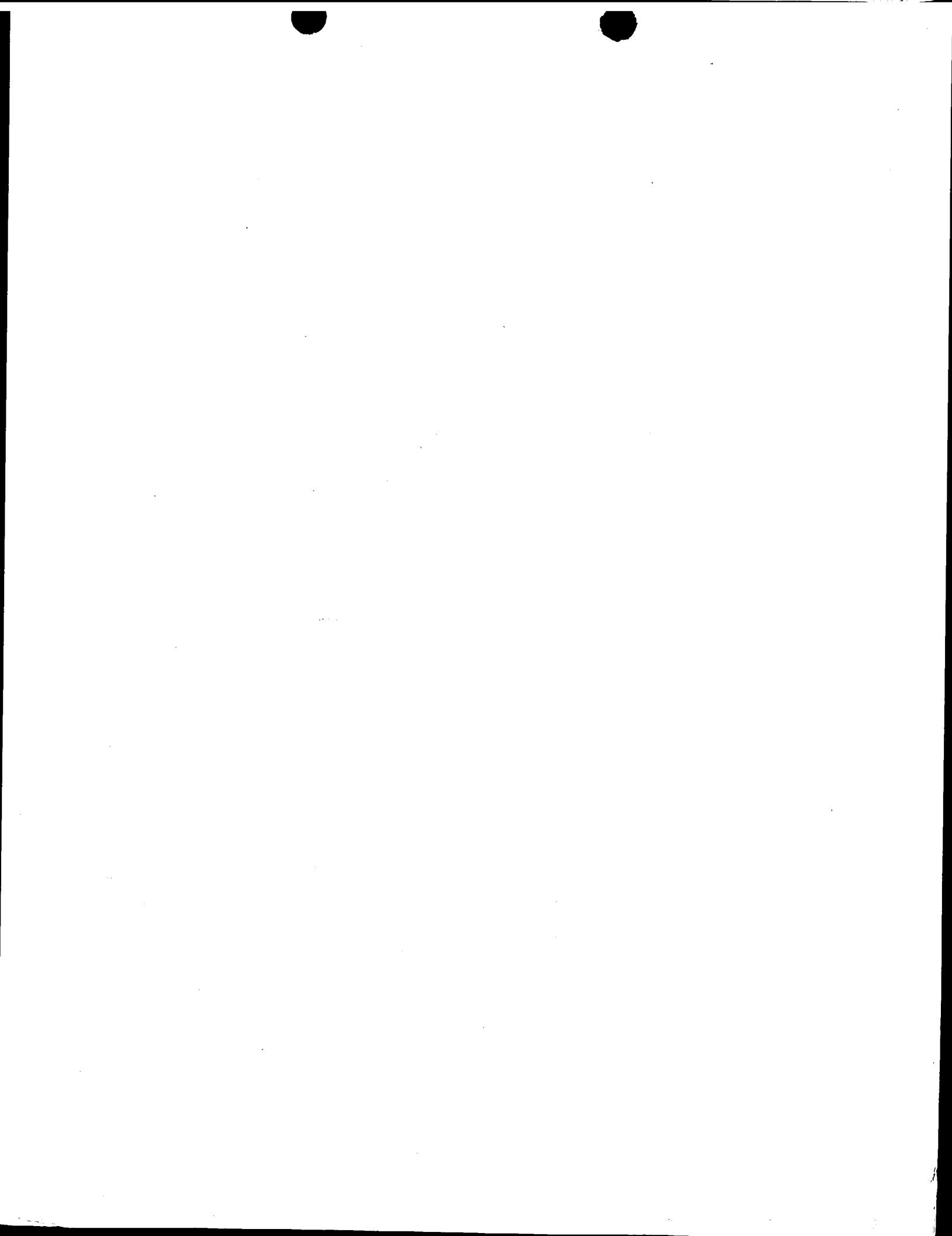
in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election was

was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Authorized officer Manu Berrod Telephone No.: (41-22) 338.83.38
-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----------------------------------------------------------------------



VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts 18657P WO	WEITERES VORGEHEN	siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsberichts (Formblatt PCT/IPEA/416)
Internationales Aktenzeichen PCT/EP99/08211	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 29/10/1999	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Tag) 30/10/1998

Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK
C12Q1/70

Anmelder

ROCHE DIAGNOSTICS GMBH et al.

1. Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.

2. Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 11 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.

Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).

Diese Anlagen umfassen insgesamt 8 Blätter.

3. Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:

I Grundlage des Berichts
II Priorität
III Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erforderliche Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
IV Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
V Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erforderlichen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
VI Bestimmte angeführte Unterlagen
VII Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
VIII Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Datum der Einreichung des Antrags 19/04/2000	Datum der Fertigstellung dieses Berichts 05.01.2001
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde: Europäisches Patentamt D-80298 München	Bevollmächtigter Bediensteter Knudsen, H



INTERNATIONALER V. ÄUFIGER
PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/EP99/08211

I. Grundlage des Berichts

1. Dieser Bericht wurde erstellt auf der Grundlage (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigefügt, weil sie keine Änderungen enthalten.*):
Beschreibung, Seiten:

1-21 ursprüngliche Fassung

Patentansprüche, Nr.:

1-12,15-21 ursprüngliche Fassung

13,14 eingegangen am 28/11/2000 mit Schreiben vom 28/11/2000

Sequenzprotokoll in der Beschreibung, Seiten:

1-7, eingereicht mit Schreiben vom 12.05.2000.

2. Hinsichtlich der **Sprache**: Alle vorstehend genannten Bestandteile standen der Behörde in der Sprache, in der die internationale Anmeldung eingereicht worden ist, zur Verfügung oder wurden in dieser eingereicht, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

Die Bestandteile standen der Behörde in der Sprache: zur Verfügung bzw. wurden in dieser Sprache eingereicht; dabei handelt es sich um

- die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen Recherche eingereicht worden ist (nach Regel 23.1(b)).
- die Veröffentlichungssprache der internationalen Anmeldung (nach Regel 48.3(b)).
- die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen vorläufigen Prüfung eingereicht worden ist (nach Regel 55.2 und/oder 55.3).

3. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale vorläufige Prüfung auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das:

- in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.
- zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.
- bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.
- Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfassten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

4. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

- Beschreibung, Seiten:

INTERNATIONALER VORÄUFIGER
PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/EP99/08211

Ansprüche, Nr.:
 Zeichnungen, Blatt:

5. Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)).

(Auf Ersatzblätter, die solche Änderungen enthalten, ist unter Punkt 1 hinzuweisen; sie sind diesem Bericht beizufügen).

6. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:
siehe Beiblatt

III. Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erforderliche Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit

1. Folgende Teile der Anmeldung wurden nicht daraufhin geprüft, ob die beanspruchte Erfindung als neu, auf erforderlicher Tätigkeit beruhend (nicht offensichtlich) und gewerblich anwendbar anzusehen ist:

die gesamte internationale Anmeldung.
 Ansprüche Nr. 4-10.,

Begründung:

Die gesamte internationale Anmeldung, bzw. die obengenannten Ansprüche Nr. beziehen sich auf den nachstehenden Gegenstand, für den keine internationale vorläufige Prüfung durchgeführt werden braucht (*genaue Angaben*):

Die Beschreibung, die Ansprüche oder die Zeichnungen (*machen Sie hierzu nachstehend genaue Angaben*) oder die obengenannten Ansprüche Nr. 4-7,9 sind so unklar, daß kein sinnvolles Gutachten erstellt werden konnte (*genaue Angaben*):
siehe Beiblatt

Die Ansprüche bzw. die obengenannten Ansprüche Nr. 6-10 sind so unzureichend durch die Beschreibung gestützt, daß kein sinnvolles Gutachten erstellt werden konnte.

Für die obengenannten Ansprüche Nr. wurde kein internationaler Recherchenbericht erstellt.

2. Eine sinnvolle internationale vorläufige Prüfung kann nicht durchgeführt werden, weil das Protokoll der Nukleotid- und/oder Aminosäuresequenzen nicht dem in Anlage C der Verwaltungsvorschriften vorgeschriebenen Standard entspricht:

Die schriftliche Form wurde nicht eingereicht bzw. entspricht nicht dem Standard.
 Die computerlesbare Form wurde nicht eingereicht bzw. entspricht nicht dem Standard.

IV. Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER
PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/EP99/08211

1. Auf die Aufforderung zur Einschränkung der Ansprüche oder zur Zahlung zusätzlicher Gebühren hat der Anmelder:
 - die Ansprüche eingeschränkt.
 - zusätzliche Gebühren entrichtet.
 - zusätzliche Gebühren unter Widerspruch entrichtet.
 - weder die Ansprüche eingeschränkt noch zusätzliche Gebühren entrichtet.
2. Die Behörde hat festgestellt, daß das Erfordernis der Einheitlichkeit der Erfindung nicht erfüllt ist, und hat gemäß Regel 68.1 beschlossen, den Anmelder nicht zur Einschränkung der Ansprüche oder zur Zahlung zusätzlicher Gebühren aufzufordern.
3. Die Behörde ist der Auffassung, daß das Erfordernis der Einheitlichkeit der Erfindung nach den Regeln 13.1, 13.2 und 13.3
 - erfüllt ist
 - aus folgenden Gründen nicht erfüllt ist:
siehe Beiblatt
4. Daher wurde zur Erstellung dieses Berichts eine internationale vorläufige Prüfung für folgende Teile der internationalen Anmeldung durchgeführt:
 - alle Teile.
 - die Teile, die sich auf die Ansprüche Nr. beziehen.

V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Feststellung

Neuheit (N)	Ja: Ansprüche 1-3,11-12,16,18-19	
	Nein: Ansprüche 13-15,17,20-21	
Erfinderische Tätigkeit (ET)	Ja: Ansprüche	
	Nein: Ansprüche 1-3,11-21	
Gewerbliche Anwendbarkeit (GA)	Ja: Ansprüche 1-3,11-21	
	Nein: Ansprüche	

2. Unterlagen und Erklärungen
siehe Beiblatt

VI. Bestimmte angeführte Unterlagen

1. Bestimmte veröffentlichte Unterlagen (Regel 70.10)

**INTERNATIONALER VORLÄUFIGER
PRÜFUNGSBERICHT**

Internationales Aktenzeichen PCT/EP99/08211

und / oder

2. Nicht-schriftliche Offenbarungen (Regel 70.9)

siehe Beiblatt

VIII. Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Zur Klarheit der Patentansprüche, der Beschreibung und der Zeichnungen oder zu der Frage, ob die Ansprüche in vollem Umfang durch die Beschreibung gestützt werden, ist folgendes zu bemerken:

siehe Beiblatt

PUNKT I:

Es ist für die Internationale Prüfungsbehörde nicht möglich, die mit dem Schreiben vom 12.05.2000 eingereichten Sequenzen mit den ursprünglich eingereichten zu vergleichen, und der vorliegende Prüfungsbericht basiert daher auf den in der ursprünglichen Anmeldung (Seiten 22-27) angegebenen Sequenzen.

PUNKT III:

- 3.1 Die Zahl der Subtypen, die in einem Verfahren detektiert werden, hängt von den Bedingungen ab, die während des Verfahrens verwendet werden. Es ist daher nicht möglich, die Auswahl der Oligonukleotide durch die Subtypen, die detektiert werden können, klar zu definieren. Der Anmelder argumentiert, daß der Fachmann ohne Weiteres durch Sequenzvergleiche feststellen könne, ob ein Verfahren einen Subtyp detektiere oder nicht. Die Prüfungsbehörde ist jedoch der Auffassung, daß dies nichts an das grundsätzliche Problem ändert, nämlich daß das Verfahren durch das zu erreichen Ziel nicht in klarer Weise definiert werden kann, weil der erfolgreiche Nachweis von vielen in den Ansprüchen undefinierten Faktoren abhängt. Die Ansprüche 4-5, 7 und 9 können daher wegen fehlender Klarheit nicht geprüft werden.
- 3.2 Auch in Anspruch 6 wird die Auswahl der Oligonukleotide durch das zu erreichende Ziel definiert. Daß die Gesamtheit der Oligonukleotide einen subtyp- und/oder speziesspezifischen Nachweis von HIV erlaubt, gibt wenig, wenn überhaupt, Auskunft über die anzuwendenden subtyp-spezifischen Oligonukleotide, weil es nicht klar ist, wieviele Subtypen detektiert werden müssen. Auch Anspruch 6 muß daher wegen fehlender Klarheit ungeprüft bleiben.
- 3.3 Die Beschreibung erwähnt mit keinem Wort, wie die im Verfahren gemäß den Ansprüchen 6-10 einzusetzenden spezies-spezifischen Primer ausgewählt werden. Diese Ansprüche können daher auch wegen fehlender Stütze in der Beschreibung nicht geprüft werden.

PUNKT IV:

4.1 Da konservierte Regionen im HIV-Genom aus dem Stand der Technik, nämlich D1-D6 und D11 bekannt sind, scheinen die in den Ansprüchen 13-15 erwähnten Oligonukleotidsequenzen keine gemeinsamen Merkmale, die ein gemeinsames erfinderisches Konzept darstellen könnten, zu besitzen.

PUNKT V:

NEUHEIT:

5.1 Die folgenden Dokumente sind für die Ansprüche 13-15, 17 und 20-21 neuheitsschädlich. Der Anmelder hat die Ansprüche 13 und 14 so geändert, daß die beanspruchten Oligonukleotide auf einer Länge von zwischen 15 und 30 Nukleotiden mit einer der durch eine der in SEQ ID NO:4, 5, 9 oder 10 dargestellten Sequenzen identisch sein müssen. Dies reicht jedoch nicht aus, um den Anmeldungsgegenstand von den Oligonukleotiden, die über eine Länge von mehr als 30 Nukleotiden mit den genannten Sequenzen übereinstimmen, abzugrenzen.

D7: WO 98/44945

D7 beschreibt einen mutierten HIV-Stamm, L2, mit einer deaktivierten Protease. Jedoch überlappen 36 Nukleotide der Sequenz des bekannten LAI Stammes, die in SEQ ID NO.1 gezeigt wird, mit der SEQ ID NO.4 der vorliegenden Anmeldung. Die **Ansprüche 13 und 14** sind daher nicht neu gegenüber D7.

D8: WO 92/15708

D8 beschreibt ein Verfahren zur Verbesserung der Sensitivität. Als Beispiel für eine HIV-Probe wird die 839 (siehe Tabelle 1) verwendet. Diese Probe überlappt über einer Länge von 31 Nukleotiden mit der SEQ ID NO.10. Der Disclaimer in Anspruch 13 entspricht z.T. der Probe 839, jedoch sind die letzten 8 Nukleotide der Disclaimer-Sequenz nicht von 839 umfaßt und 839 ist daher neuheitsschädlich für die **Ansprüche 13 und 17**.

D10: WO 96/02557

D10 beschreibt Oligonukleotide für die Inhibierung des HIV-1 Wachstums oder für den Nachweis von HIV-1. SEQ ID NO.2 überlappt mit der gesamten Sequenz der

SEQ ID NO. 16 der vorliegenden Anmeldung. **Anspruch 15** ist daher nicht neu.

D11: EP-A-0 229 701

D11 beschreibt ein Verfahren zum Nachweis von HIV, worin ein Primer, der an eine konservierte Region bindet, verwendet wird (siehe S.3, Z.50). Die Probe SK34, die im Beispiel 5 zum Nachweis von HIV ohne Kultivierung verwendet wird, überlappt auf einer Länge von 34 Nukleotiden mit SEQ ID NO.9 der vorliegenden Anmeldung und ist daher neuheitsschädlich für die vorliegenden **Ansprüche 13-14 und 20-21**.

D12: EMBL Database, Entry AGPROTF3, Accession number M24551, (1989)

D12 beschreibt eine synthetische HIV-1 Protease kodierendes Gen, wovon 58 Nukleotide mit der SEQ ID NO.5 überlappen. Die **Ansprüche 13 und 14** sind daher nicht neu gegenüber D12.

ERFINDERISCHE TÄTIGKEIT:

5.2 Die Ansprüche 1 und 18-19 unterscheiden sich vom D11 nur darin, daß mindestens zwei Oligonukleotide verwendet werden, die 10-80 Nukleotide aus derselben hochkonservierten Region dargestellt durch eine der Sequenzen SEQ ID NO: 1 bis 13 umfassen. Die Prüfungsbehörde ist jedoch der Auffassung, daß die Verwendung von zwei Oligonukleotiden, die an einer konservierten Region binden, für den Fachmann, der mittels PCR eine konservierte Region amplifizieren möchte, naheliegend wäre.

Der Anmelder argumentiert, daß in der Tabelle in der Anmeldung eine verbesserte Sensitivität der Primer, die die SEQ ID NOs 8, 10, 11 und 13 amplifizieren gegenüber den in D11 beschriebenen Primern gezeigt wird. Die Prüfungsbehörde ist jedoch der Meinung, daß dieses Beispiel nicht ausreicht, um einen gegenüber D11 verbesserten, subtyp-übergreifenden Nachweis darzustellen. Das Beispiel verwendet ein einziges Isolat eines HIV-Stamms und kann daher nicht als Nachweis für die subtyp-übergreifenden Ähnlichkeiten der Sequenzen (SEQ ID NOs 1-13) dienen (siehe auch Punkt VIII).

Es ist daher nicht klar, ob das in der Beschreibung angegebene Problem durch den Gegenstand der Ansprüche 1 und 18-19 gelöst wird, und es ist gar nicht nachgewiesen, daß ein objektives Problem im Lichte von D11 gelöst wird. Die

Ansprüche 1 und 18-19 werden daher als nicht erfinderisch erachtet.

5.3 Alle folgenden Dokumente D1-D6 beschreiben Verfahren, die genau dasselbe Ziel wie das Verfahren gemäß Anspruch 1 haben, nämlich der subtyp- und/oder speziesübergreifende Nachweis von HIV.

D1: EP-A-0 854 197

D1 beschreibt **gag**-Primer, die die gleichzeitige Amplifizierung aller Subtypen der HIV-1 Gruppe M ermöglichen.

D2: EP-A-0 727 497

D2 beschreibt **pol**-Primer, die den Nachweis aller HIV-1 Subtypen ermöglichen.

D3: EP-A-0 617 132

D3 beschreibt HIV-Proben, die den spezifischen Nachweis von HIV-1 in Anwesenheit ähnlicher Viren ermöglichen.

D4: EP-A-0 516 540

D4 beschreibt die Anwendung von Oligonukleotiden, die in allen HIVs vorkommen. Die genannten Regionen sind unterschiedlich von den in der vorliegenden Anmeldung genannten.

D5: EP-A-0 839 917

D5 beschreibt Proben aus der 3'-Region des **gag**-Gens, mit denen bedeutend mehr Subtypen als mit den bisherigen Proben nachgewiesen werden können.

D6: EP-A-0 806 484

D6 beschreibt Proben, die an HIV-1 und verwandte Viren (HIV-2 und SIV) binden.

Der Gegenstand der Ansprüche 1 und 18-19 unterscheidet sich von diesen Dokumenten nur in den verwendeten Oligonukleotiden. Für den Fachmann wäre die Auswahl anderer konservierter Oligonukleotide zum Nachweis von HIV naheliegend. Eine erfinderische Tätigkeit könnte daher nur anerkannt werden, falls der Anmelder beweisen würde, daß die im beanspruchten Verfahren

verwendeten Oligonukleotide Vorteile im subtyp-übergreifenden Nachweisverfahren bringen und dadurch ein technisches Problem lösen würden. Wie oben erläutert, ist solche Information jedoch in der Anmeldung nicht enthalten und die Ansprüche 1 und 18-19 werden daher auch im Lichte von D1-D6 als nicht erfinderisch erachtet.

- 5.4 Die Ansprüche 2, 3 und 12 enthalten Merkmale, die im Stand der Technik routinemäßig verwendet werden, und werden daher als nicht erfinderisch angesehen.
- 5.5 Da in D10 Oligonukleotide, die zumindest Teile der Sequenzen mit SEQ ID NOs: 14 und 16 enthalten, für den Nachweis von HIV verwendet werden, würde der Fachmann, der die Lehre von D10 mit D11 oder mit D1-D6 kombinieren würde, zum Gegenstand des Anspruchs 11 erlangen. Somit wird Anspruch 11 als nicht erfinderisch angesehen.
- 5.6 Für den Fachmann ist es naheliegend, Oligonukleotide, die wenige Mismatches mit den verschiedenen HIV-Subtypen haben, zu identifizieren, und da dies gemäß der Antwort des Anmelders ohne weiteres durch Sequenzvergleiche möglich ist, scheint der Gegenstand des Anspruchs 16 auf keiner erfinderischen Tätigkeit zu beruhen.

GEWERBLICHE ANWENDBARKEIT:

- 5.7 Der gesamte Anspruchsgegenstand scheint gewerblich anwendbar zu sein.

P-DOKUMENTE:

- 5.8 J. Clin. Microbiol., Bd.37(6), Seiten 1813-1818, (Juni 1999)

Dieses Dokument ist nach dem Prioritätstag, aber vor dem Anmeldungstag der vorliegenden Anmeldung veröffentlicht worden. Es ist daher nur für die Prüfung der Anspruchsgegenstände der vorliegenden Anmeldung relevant, die keinen gültigen Prioritätsanspruch haben.

PUNKT VI:

Bestimmte veröffentlichte Unterlagen (Regel 70.10)

Anmelde Nr. Patent Nr.	Veröffentlichungsdatum (Tag/Monat/Jahr)	Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr)	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr)
WO 98/58086	23.12.1998	04.06.1998	16.06.1997
WO 99/07898	18.02.1999	05.08.1998	08.08.1997
EP-A-0 887 427	30.12.1998	24.06.1998	25.06.1997

Die Priorität dieser Dokumente ist nicht geprüft worden.

Die obengenannten Dokumente sind nach dem Prioritätstag, aber vor dem Anmeldungstag der vorliegenden Anmeldung veröffentlicht worden. Sie sind daher nur für die Prüfung der Anspruchsgegenstände der vorliegenden Anmeldung relevant, die kein gültiges Prioritätsrecht genießen. In der regionalen Phase könnten die Dokumente jedoch auch für die Neuheitsprüfung der ganzen Anmeldung von Bedeutung werden.

PUNKT VIII:

- 8.1 Die Definition der Oligonukleotide in Anspruch 1 ist nicht klar, weil der Ausdruck "einer entsprechenden Region" unklar ist. In der Beschreibung (Seite 11, zweiter Absatz) wird ausgeführt, daß die Sequenzen in den konservierten Regionen nicht auf eine einzige Sequenz begrenzt sind. Es ist jedoch für den Fachmann nicht klar, in wie weit eine Sequenz eines HIV-Isolats von den Sequenzen in den SEQ ID NOS: 1 bis 13 abweichen darf, um im beanspruchten Verfahren noch verwendbar zu sein. Anspruch 1 wird daher als nicht klar angesehen.
- 8.2 Im Beispiel der vorliegenden Anmeldung wird durch Amplifizierung mit Primers, die die Sequenzen SEQ ID NOs: 8, 11 und 13 amplifizieren eine höhere Spezifität erreicht, als mit im Stand der Technik verwendeten Primern. Diese HIV-1 Spezifität ist jedoch etwas ganz anderes als ein subtyp- und/oder speziesübergreifendes Verfahren. Die Anmeldung enthält keine Dokumentation dafür, daß ein subtyp- und/oder speziesübergreifendes Verfahren mit Primern mit den Sequenzen mit SEQ ID NOs: 1 bis 13 möglich ist.

28. Nov. 2000

18657P WO

Roche Diagnostics GmbH
PCT/EP99/08211

Neue Ansprüche 13 und 14

13. Oligonukleotid,
dadurch gekennzeichnet,
daß es 15 bis 30 aufeinanderfolgende Nukleotide aus
(i) einer hochkonservierten Region des *pol*-Gens von HIV,
dargestellt durch eine der in SEQ ID NO: 4, 5, 9 oder 10
angegebenen Sequenzen,
(ii) einer entsprechenden Region eines anderen HI-Virusisolats,
(iii) einer entsprechenden Region einer aus mehreren HI-
Virusisolaten stammenden Konsensussequenz,
oder dazu komplementären Sequenzen umfaßt,
mit der Maßgabe, daß es nicht die Nukleotidsequenz
CTACTACTCC TTGACTTTGG GGATTG
oder deren Komplementärsequenz umfaßt.

14. Oligonukleotid nach Anspruch 13,
dadurch gekennzeichnet,
daß es 15 bis 30 aufeinanderfolgende Nukleotide aus
(i) einer hochkonservierten Region des *pol*-Gens von HIV,
dargestellt durch eine der in SEQ ID NO: 4, 5 oder 9
angegebenen Sequenzen,
(ii) einer entsprechenden Region eines anderen HI-Virusisolats,
(iii) einer entsprechenden Region einer aus mehreren HI-
Virusisolaten stammenden Konsensussequenz,
oder dazu komplementären Sequenzen umfaßt.

12-05-00

SEQUENZPROTOKOLL

<110> Roche Diagnostics GmbH

<120> Neue Primer und Sonden zum Nachweis von HIV

<130> 18657pwomd

<140> PCT/EP99/08211

<141> 1999-10-29

<150> DE 19850186.2

<151> 1998-10-30

<160> 25

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 62

<212> DNA

<213> HIV

<400> 1

aggaaaccca ctgcttaagc ctcaataaaag cttgccttga gtgcttcaag tagtgtgtgc 60
cc 62

♦

<210> 2

<211> 62

<212> DNA

<213> HIV

<400> 2

tttgactagc ggaggctaga aggagagaga tgggtgcgag agcgtcagta ttaagcgggg 60
ga 62

<210> 3

<211> 62

<212> DNA

<213> HIV

<400> 3

attttaaaag cattgggacc agcggctaca ctagaagaaa ttagtgcacgc atgtcaggga 60
gt 62

12-05-00

<210> 4

<211> 54

<212> DNA

<213> HIV

<400> 4

ctaaaggaag ctctattaga tacaggagca gatgatacag tattagaaga aatg

54

<210> 5

<211> 59

<212> DNA

<213> HIV

<400> 5

tggaaaccaa aatgataagg gggatttggaa gttttatca aagtaagaca gtatgatca

59

<210> 6

<211> 65

<212> DNA

<213> HIV

<400> 6

actgtaccag taaaattaaa gccaggaatg gatggccaa aagttaaaca atggccattg
acaga

60
65

<210> 7

<211> 53

<212> DNA

<213> HIV

<400> 7

caatacatgg atgatttgta tgtaggatct gacttagaaa tagggcagca tag

53

<210> 8

<211> 77

<212> DNA

<213> HIV

<400> 8

aaggaaaagg tctatctggc atgggtacca gcacacaaag gaattggagg aaatgaacaa
gtagataaat tagtcag

60
77

<210> 9

312-05-00

<211> 67

<212> DNA

<213> HIV

<400> 9

aaatagtagc cagctgtgat aaatgtcagc taaaaggaga agccatgcat ggacaagtag 60
actgttag 67

<210> 10

<211> 59

<212> DNA

<213> HIV

<400> 10

caggaatttg gaattcccta caatccccaa agtcaaggag tagtagaatac tatgaataa 59

<210> 11

<211> 101

<212> DNA

<213> HIV

<400> 11

aaaattcaaa attttcgggt ttattacagg gacagcagaa atccactttg gaaaggacca 60
gcaaagctcc tctggaaagg tgaaggggca gtagtaatac a 101

<210> 12

<211> 62

<212> DNA

<213> HIV

<400> 12

agggattatg gaaaacagat ggcaggtgat gattgtgtgg caagtagaca ggatgaggat 60
ta 62

<210> 13

<211> 97

<212> DNA

<213> HIV

<400> 13

tggcaactag attgtacaca tttagaagga aaagttatcc tggtagcagt tcattgttagcc 60
agtggatata tagaaggcaga agttattcca gcagaaaa 97

12.05.00

<210> 14
<211> 20
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer GH
A2F

<400> 14
tacctggcat gggtaaccagc

20

<210> 15
<211> 26
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer GH
A2R

<400> 15
gactaattta tctacttgtt catttc

26

<210> 16
<211> 18
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer GH
A2P

<400> 16
cacacaaagg aattggag

18

<210> 17
<211> 20
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer GH
A3F

12.05.00

<400> 17
tttggatttc cctacaatcc

20

<210> 18
<211> 26
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer GH
A3R

<400> 18
aattctttat tcatacgattc tactac

26

<210> 19
<211> 15
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer GH
A3P

<400> 19
cccaaagtca aggag

15

<210> 20
<211> 24
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer GH
A4F

<400> 20
tcaaaatttt cgggttattt acag

24

<210> 21
<211> 20
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

M 12.05.00

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer GH
A4R

<400> 21

agctttgctg gtcctttcca

20

<210> 22

<211> 19

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer GH
A4P

<400> 22

ggacacgaga aatccactt

19

<210> 23

<211> 26

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer GH
A6F

<400> 23

gcaactagat tgtacacatt tagaag

26

<210> 24

<211> 25

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer GH
A6R

<400> 24

cttctatata tccactggct acatg

25

<210> 25

12-06-01

<211> 23

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

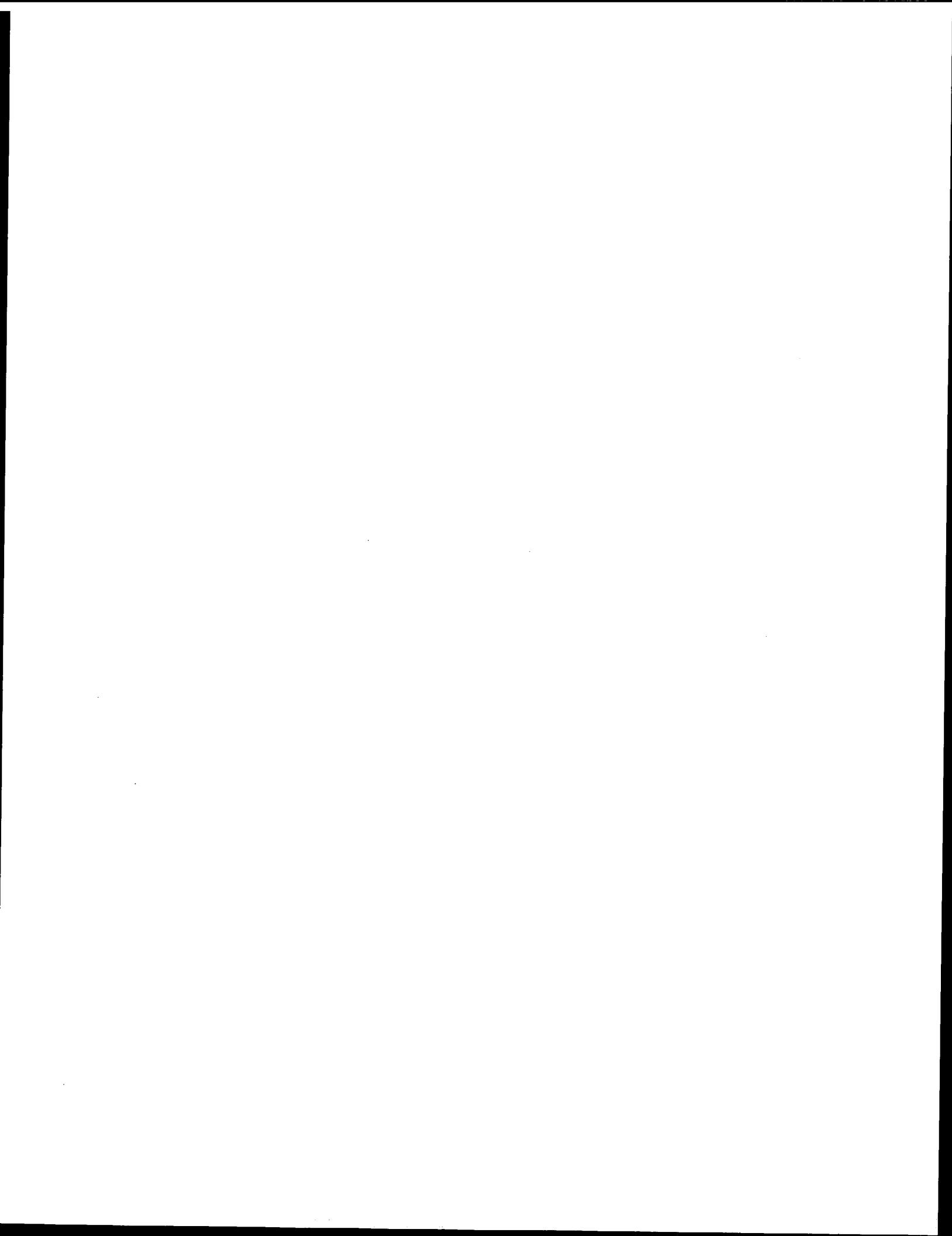
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer GH

A6P

<400> 25

qaaaqttat cctggtagca gtt

23



VERTRAG ÜBER INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM
GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

REC'D 11 JAN 2001

WIPO

PCT

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)

T4

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts 18657P WO	WEITERES VORGEHEN	siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsberichts (Formblatt PCT/IPEA/416)
Internationales Aktenzeichen PCT/EP99/08211	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 29/10/1999	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 30/10/1998
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK C12Q1/70		
Anmelder ROCHE DIAGNOSTICS GMBH et al.		

<p>1. Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.</p> <p>2. Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 11 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).</p> <p>Diese Anlagen umfassen insgesamt 8 Blätter.</p>
<p>3. Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:</p> <ul style="list-style-type: none"> I <input checked="" type="checkbox"/> Grundlage des Berichts II <input type="checkbox"/> Priorität III <input checked="" type="checkbox"/> Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit IV <input checked="" type="checkbox"/> Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung V <input checked="" type="checkbox"/> Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung VI <input checked="" type="checkbox"/> Bestimmte angeführte Unterlagen VII <input type="checkbox"/> Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung VIII <input checked="" type="checkbox"/> Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Datum der Einreichung des Antrags 19/04/2000	Datum der Fertigstellung dieses Berichts 05.01.2001
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde: Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 eprmu d	Bevollmächtigter Bediensteter Knudsen, H



I. Grundlage des Berichts

1. Dieser Bericht wurde erstellt auf der Grundlage (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigefügt, weil sie keine Änderungen enthalten.;*)

Beschreibung, Seiten:

1-21 ursprüngliche Fassung

Patentansprüche, Nr.:

1-12,15-21 ursprüngliche Fassung

13,14 eingegangen am 28/11/2000 mit Schreiben vom 28/11/2000

Sequenzprotokoll in der Beschreibung, Seiten:

1-7, eingereicht mit Schreiben vom 12.05.2000.

2. Hinsichtlich der **Sprache**: Alle vorstehend genannten Bestandteile standen der Behörde in der Sprache, in der die internationale Anmeldung eingereicht worden ist, zur Verfügung oder wurden in dieser eingereicht, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

Die Bestandteile standen der Behörde in der Sprache: zur Verfügung bzw. wurden in dieser Sprache eingereicht; dabei handelt es sich um

- die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen Recherche eingereicht worden ist (nach Regel 23.1(b)).
- die Veröffentlichungssprache der internationalen Anmeldung (nach Regel 48.3(b)).
- die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen vorläufigen Prüfung eingereicht worden ist (nach Regel 55.2 und/oder 55.3).

3. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale vorläufige Prüfung auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das:

- in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.
- zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.
- bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.
- Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfassten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

4. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

- Beschreibung, Seiten:

**INTERNATIONALER VORLÄUFIGER
PRÜFUNGSBERICHT**

Internationales Aktenzeichen PCT/EP99/08211

Ansprüche, Nr.:
 Zeichnungen, Blatt:

5. Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)).

(Auf Ersatzblätter, die solche Änderungen enthalten, ist unter Punkt 1 hinzuweisen; sie sind diesem Bericht beizufügen).

6. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:
siehe Beiblatt

III. Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit

1. Folgende Teile der Anmeldung wurden nicht daraufhin geprüft, ob die beanspruchte Erfindung als neu, auf erfinderischer Tätigkeit beruhend (nicht offensichtlich) und gewerblich anwendbar anzusehen ist:

die gesamte internationale Anmeldung.
 Ansprüche Nr. 4-10.,

Begründung:

Die gesamte internationale Anmeldung, bzw. die obengenannten Ansprüche Nr. beziehen sich auf den nachstehenden Gegenstand, für den keine internationale vorläufige Prüfung durchgeführt werden braucht (*genaue Angaben*):

Die Beschreibung, die Ansprüche oder die Zeichnungen (*machen Sie hierzu nachstehend genaue Angaben*) oder die obengenannten Ansprüche Nr. 4-7,9 sind so unklar, daß kein sinnvolles Gutachten erstellt werden konnte (*genaue Angaben*):
siehe Beiblatt

Die Ansprüche bzw. die obengenannten Ansprüche Nr. 6-10 sind so unzureichend durch die Beschreibung gestützt, daß kein sinnvolles Gutachten erstellt werden konnte.

Für die obengenannten Ansprüche Nr. wurde kein internationaler Recherchenbericht erstellt.

2. Eine sinnvolle internationale vorläufige Prüfung kann nicht durchgeführt werden, weil das Protokoll der Nukleotid- und/oder Aminosäuresequenzen nicht dem in Anlage C der Verwaltungsvorschriften vorgeschriebenen Standard entspricht:

Die schriftliche Form wurde nicht eingereicht bzw. entspricht nicht dem Standard.
 Die computerlesbare Form wurde nicht eingereicht bzw. entspricht nicht dem Standard.

IV. Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung

1. Auf die Aufforderung zur Einschränkung der Ansprüche oder zur Zahlung zusätzlicher Gebühren hat der Anmelder:
 - die Ansprüche eingeschränkt.
 - zusätzliche Gebühren entrichtet.
 - zusätzliche Gebühren unter Widerspruch entrichtet.
 - weder die Ansprüche eingeschränkt noch zusätzliche Gebühren entrichtet.
2. Die Behörde hat festgestellt, daß das Erfordernis der Einheitlichkeit der Erfindung nicht erfüllt ist, und hat gemäß Regel 68.1 beschlossen, den Anmelder nicht zur Einschränkung der Ansprüche oder zur Zahlung zusätzlicher Gebühren aufzufordern.
3. Die Behörde ist der Auffassung, daß das Erfordernis der Einheitlichkeit der Erfindung nach den Regeln 13.1, 13.2 und 13.3
 - erfüllt ist
 - aus folgenden Gründen nicht erfüllt ist:
siehe Beiblatt
4. Daher wurde zur Erstellung dieses Berichts eine internationale vorläufige Prüfung für folgende Teile der internationalen Anmeldung durchgeführt:
 - alle Teile.
 - die Teile, die sich auf die Ansprüche Nr. beziehen.

V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Feststellung

Neuheit (N)	Ja: Ansprüche 1-3,11-12,16,18-19	
	Nein: Ansprüche 13-15,17,20-21	
Erfinderische Tätigkeit (ET)	Ja: Ansprüche	
	Nein: Ansprüche 1-3,11-21	
Gewerbliche Anwendbarkeit (GA)	Ja: Ansprüche 1-3,11-21	
	Nein: Ansprüche	

**2. Unterlagen und Erklärungen
siehe Beiblatt**

VI. Bestimmte angeführte Unterlagen

1. Bestimmte veröffentlichte Unterlagen (Regel 70.10)

**INTERNATIONALER VORLÄUFIGER
PRÜFUNGSBERICHT**

Internationales Aktenzeichen PCT/EP99/08211

und / oder

2. Nicht-schriftliche Offenbarungen (Regel 70.9)

siehe Beiblatt

VIII. Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Zur Klarheit der Patentansprüche, der Beschreibung und der Zeichnungen oder zu der Frage, ob die Ansprüche in vollem Umfang durch die Beschreibung gestützt werden, ist folgendes zu bemerken:
siehe Beiblatt

PUNKT I:

Es ist für die Internationale Prüfungsbehörde nicht möglich, die mit dem Schreiben vom 12.05.2000 eingereichten Sequenzen mit den ursprünglich eingereichten zu vergleichen, und der vorliegende Prüfungsbericht basiert daher auf den in der ursprünglichen Anmeldung (Seiten 22-27) angegebenen Sequenzen.

PUNKT III:

- 3.1 Die Zahl der Subtypen, die in einem Verfahren detektiert werden, hängt von den Bedingungen ab, die während des Verfahrens verwendet werden. Es ist daher nicht möglich, die Auswahl der Oligonukleotide durch die Subtypen, die detektiert werden können, klar zu definieren. Der Anmelder argumentiert, daß der Fachmann ohne Weiteres durch Sequenzvergleiche feststellen könne, ob ein Verfahren einen Subtyp detektiere oder nicht. Die Prüfungsbehörde ist jedoch der Auffassung, daß dies nichts an das grundsätzliche Problem ändert, nämlich daß das Verfahren durch das zu erreichen Ziel nicht in klarer Weise definiert werden kann, weil der erfolgreiche Nachweis von vielen in den Ansprüchen undefinierten Faktoren abhängt. Die Ansprüche 4-5, 7 und 9 können daher wegen fehlender Klarheit nicht geprüft werden.
- 3.2 Auch in Anspruch 6 wird die Auswahl der Oligonukleotide durch das zu erreichende Ziel definiert. Daß die Gesamtheit der Oligonukleotide einen subtyp- und/oder speziesspezifischen Nachweis von HIV erlaubt, gibt wenig, wenn überhaupt, Auskunft über die anzuwendenden subtyp-spezifischen Oligonukleotide, weil es nicht klar ist, wieviele Subtypen detektiert werden müssen. Auch Anspruch 6 muß daher wegen fehlender Klarheit ungeprüft bleiben.
- 3.3 Die Beschreibung erwähnt mit keinem Wort, wie die im Verfahren gemäß den Ansprüchen 6-10 einzusetzenden spezies-spezifischen Primer ausgewählt werden. Diese Ansprüche können daher auch wegen fehlender Stütze in der Beschreibung nicht geprüft werden.

PUNKT IV:

4.1 Da konservierte Regionen im HIV-Genom aus dem Stand der Technik, nämlich D1-D6 und D11 bekannt sind, scheinen die in den Ansprüchen 13-15 erwähnten Oligonukleotidsequenzen keine gemeinsamen Merkmale, die ein gemeinsames erfinderisches Konzept darstellen könnten, zu besitzen.

PUNKT V:

NEUHEIT:

5.1 Die folgenden Dokumente sind für die Ansprüche 13-15, 17 und 20-21 neuheitsschädlich. Der Anmelder hat die Ansprüche 13 und 14 so geändert, daß die beanspruchten Oligonukleotide auf einer Länge von zwischen 15 und 30 Nukleotiden mit einer der durch eine der in SEQ ID NO:4, 5, 9 oder 10 dargestellten Sequenzen identisch sein müssen. Dies reicht jedoch nicht aus, um den Anmeldungsgegenstand von den Oligonukleotiden, die über eine Länge von mehr als 30 Nukleotiden mit den genannten Sequenzen übereinstimmen, abzugrenzen.

D7: WO 98/44945

D7 beschreibt einen mutierten HIV-Stamm, L2, mit einer deaktivierten Protease. Jedoch überlappen 36 Nukleotide der Sequenz des bekannten LAI Stammes, die in SEQ ID NO.1 gezeigt wird, mit der SEQ ID NO.4 der vorliegenden Anmeldung. Die **Ansprüche 13 und 14** sind daher nicht neu gegenüber D7.

D8: WO 92/15708

D8 beschreibt ein Verfahren zur Verbesserung der Sensitivität. Als Beispiel für eine HIV-Probe wird die 839 (siehe Tabelle 1) verwendet. Diese Probe überlappt über einer Länge von 31 Nukleotiden mit der SEQ ID NO.10. Der Disclaimer in Anspruch 13 entspricht z.T. der Probe 839, jedoch sind die letzten 8 Nukleotide der Disclaimer-Sequenz nicht von 839 umfaßt und 839 ist daher neuheitsschädlich für die **Ansprüche 13 und 17**.

D10: WO 96/02557

D10 beschreibt Oligonukleotide für die Inhibierung des HIV-1 Wachstums oder für den Nachweis von HIV-1. SEQ ID NO.2 überlappt mit der gesamten Sequenz der

SEQ ID NO. 16 der vorliegenden Anmeldung. **Anspruch 15** ist daher nicht neu.

D11: EP-A-0 229 701

D11 beschreibt ein Verfahren zum Nachweis von HIV, worin ein Primer, der an eine konservierte Region bindet, verwendet wird (siehe S.3, Z.50). Die Probe SK34, die im Beispiel 5 zum Nachweis von HIV ohne Kultivierung verwendet wird, überlappt auf einer Länge von 34 Nukleotiden mit SEQ ID NO.9 der vorliegenden Anmeldung und ist daher neuheitsschädlich für die vorliegenden **Ansprüche 13-14 und 20-21**.

D12: EMBL Database, Entry AGPROTF3, Accession number M24551, (1989)

D12 beschreibt ein eine synthetische HIV-1 Protease kodierendes Gen, wovon 58 Nukleotide mit der SEQ ID NO.5 überlappen. Die **Ansprüche 13 und 14** sind daher nicht neu gegenüber D12.

ERFINDERISCHE TÄTIGKEIT:

5.2 Die Ansprüche 1 und 18-19 unterscheiden sich vom D11 nur darin, daß mindestens zwei Oligonukleotide verwendet werden, die 10-80 Nukleotide aus derselben hochkonservierten Region dargestellt durch eine der Sequenzen SEQ ID NO: 1 bis 13 umfassen. Die Prüfungsbehörde ist jedoch der Auffassung, daß die Verwendung von zwei Oligonukleotiden, die an einer konservierten Region binden, für den Fachmann, der mittels PCR eine konservierte Region amplifizieren möchte, naheliegend wäre.

Der Anmelder argumentiert, daß in der Tabelle in der Anmeldung eine verbesserte Sensitivität der Primer, die die SEQ ID NOs 8, 10, 11 und 13 amplifizieren gegenüber den in D11 beschriebenen Primern gezeigt wird. Die Prüfungsbehörde ist jedoch der Meinung, daß dieses Beispiel nicht ausreicht, um einen gegenüber D11 verbesserten, subtyp-übergreifenden Nachweis darzustellen. Das Beispiel verwendet ein einziges Isolat eines HIV-Stamms und kann daher nicht als Nachweis für die subtyp-übergreifenden Ähnlichkeiten der Sequenzen (SEQ ID NOs 1-13) dienen (siehe auch Punkt VIII).

Es ist daher nicht klar, ob das in der Beschreibung angegebene Problem durch den Gegenstand der Ansprüche 1 und 18-19 gelöst wird, und es ist gar nicht nachgewiesen, daß ein objektives Problem im Lichte von D11 gelöst wird. Die

Ansprüche 1 und 18-19 werden daher als nicht erfinderisch erachtet.

5.3 Alle folgenden Dokumente D1-D6 beschreiben Verfahren, die genau dasselbe Ziel wie das Verfahren gemäß Anspruch 1 haben, nämlich der subtyp- und/oder speziesübergreifende Nachweis von HIV.

D1: EP-A-0 854 197

D1 beschreibt **gag**-Primer, die die gleichzeitige Amplifizierung aller Subtypen der HIV-1 Gruppe M ermöglichen.

D2: EP-A-0 727 497

D2 beschreibt **pol**-Primer, die den Nachweis aller HIV-1 Subtypen ermöglichen.

D3: EP-A-0 617 132

D3 beschreibt HIV-Proben, die den spezifischen Nachweis von HIV-1 in Anwesenheit ähnlicher Viren ermöglichen.

D4: EP-A-0 516 540

D4 beschreibt die Anwendung von Oligonukleotiden, die in allen HIVs vorkommen. Die genannten Regionen sind unterschiedlich von den in der vorliegenden Anmeldung genannten.

D5: EP-A-0 839 917

D5 beschreibt Proben aus der 3'-Region des **gag**-Gens, mit denen bedeutend mehr Subtypen als mit den bisherigen Proben nachgewiesen werden können.

D6: EP-A-0 806 484

D6 beschreibt Proben, die an HIV-1 und verwandte Viren (HIV-2 und SIV) binden.

Der Gegenstand der Ansprüche 1 und 18-19 unterscheidet sich von diesen Dokumenten nur in den verwendeten Oligonukleotiden. Für den Fachmann wäre die Auswahl anderer konservierter Oligonukleotide zum Nachweis von HIV naheliegend. Eine erfinderische Tätigkeit könnte daher nur anerkannt werden, falls der Anmelder beweisen würde, daß die im beanspruchten Verfahren

verwendeten Oligonukleotide Vorteile im subtyp-übergreifenden Nachweisverfahren bringen und dadurch ein technisches Problem lösen würden. Wie oben erläutert, ist solche Information jedoch in der Anmeldung nicht enthalten und die Ansprüche 1 und 18-19 werden daher auch im Lichte von D1-D6 als nicht erfinderisch erachtet.

- 5.4 Die Ansprüche 2, 3 und 12 enthalten Merkmale, die im Stand der Technik routinemäßig verwendet werden, und werden daher als nicht erfinderisch angesehen.
- 5.5 Da in D10 Oligonukleotide, die zumindest Teile der Sequenzen mit SEQ ID NOs: 14 und 16 enthalten, für den Nachweis von HIV verwendet werden, würde der Fachmann, der die Lehre von D10 mit D11 oder mit D1-D6 kombinieren würde, zum Gegenstand des Anspruchs 11 erlangen. Somit wird Anspruch 11 als nicht erfinderisch angesehen.
- 5.6 Für den Fachmann ist es naheliegend, Oligonukleotide, die wenige Mismatches mit den verschiedenen HIV-Subtypen haben, zu identifizieren, und da dies gemäß der Antwort des Anmelders ohne weiteres durch Sequenzvergleiche möglich ist, scheint der Gegenstand des Anspruchs 16 auf keiner erfinderischen Tätigkeit zu beruhen.

GEWERBLICHE ANWENDBARKEIT:

- 5.7 Der gesamte Anspruchsgegenstand scheint gewerblich anwendbar zu sein.

P-DOKUMENTE:

- 5.8 J. Clin. Microbiol., Bd.37(6), Seiten 1813-1818, (Juni 1999)

Dieses Dokument ist nach dem Prioritätstag, aber vor dem Anmeldungstag der vorliegenden Anmeldung veröffentlicht worden. Es ist daher nur für die Prüfung der Anspruchsgegenstände der vorliegenden Anmeldung relevant, die keinen gültigen Prioritätsanspruch haben.

PUNKT VI:

Bestimmte veröffentlichte Unterlagen (Regel 70.10)

Anmelde Nr. Patent Nr.	Veröffentlichungsdatum (Tag/Monat/Jahr)	Anmelddatum (Tag/Monat/Jahr)	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr)
WO 98/58086	23.12.1998	04.06.1998	16.06.1997
WO 99/07898	18.02.1999	05.08.1998	08.08.1997
EP-A-0 887 427	30.12.1998	24.06.1998	25.06.1997

Die Priorität dieser Dokumente ist nicht geprüft worden.

Die obengenannten Dokumente sind nach dem Prioritätstag, aber vor dem Anmeldungstag der vorliegenden Anmeldung veröffentlicht worden. Sie sind daher nur für die Prüfung der Anspruchsgegenstände der vorliegenden Anmeldung relevant, die kein gültiges Prioritätsrecht genießen. In der regionalen Phase könnten die Dokumente jedoch auch für die Neuheitsprüfung der ganzen Anmeldung von Bedeutung werden.

PUNKT VIII:

- 8.1 Die Definition der Oligonukleotide in Anspruch 1 ist nicht klar, weil der Ausdruck "einer entsprechenden Region" unklar ist. In der Beschreibung (Seite 11, zweiter Absatz) wird ausgeführt, daß die Sequenzen in den konservierten Regionen nicht auf eine einzige Sequenz begrenzt sind. Es ist jedoch für den Fachmann nicht klar, in wie weit eine Sequenz eines HIV-Isolats von den Sequenzen in den SEQ ID NOS: 1 bis 13 abweichen darf, um im beanspruchten Verfahren noch verwendbar zu sein. Anspruch 1 wird daher als nicht klar angesehen.
- 8.2 Im Beispiel der vorliegenden Anmeldung wird durch Amplifizierung mit Primers, die die Sequenzen SEQ ID NOs: 8, 11 und 13 amplifizieren eine höhere Spezifität erreicht, als mit im Stand der Technik verwendeten Primern. Diese HIV-1 Spezifität ist jedoch etwas ganz anderes als ein subtyp- und/oder speziesübergreifendes Verfahren. Die Anmeldung enthält keine Dokumentation dafür, daß ein subtyp- und/oder speziesübergreifendes Verfahren mit Primern mit den Sequenzen mit SEQ ID NOs: 1 bis 13 möglich ist.

18657P WO

Roche Diagnostics GmbH

PCT/EP99/08211

Neue Ansprüche 13 und 14

13. Oligonukleotid,
dadurch gekennzeichnet,
daß es 15 bis 30 aufeinanderfolgende Nukleotide aus
(i) einer hochkonservierten Region des *pol*-Gens von HIV,
dargestellt durch eine der in SEQ ID NO: 4, 5, 9 oder 10
angegebenen Sequenzen,
(ii) einer entsprechenden Region eines anderen HI-Virusisolats,
(iii) einer entsprechenden Region einer aus mehreren HI-
Virusisolaten stammenden Konsensussequenz,
oder dazu komplementären Sequenzen umfaßt,
mit der Maßgabe, daß es nicht die Nukleotidsequenz
CTACTACTCC TTGACTTTGG GGATTG
oder deren Komplementärsequenz umfaßt.

14. Oligonukleotid nach Anspruch 13,
dadurch gekennzeichnet,
daß es 15 bis 30 aufeinanderfolgende Nukleotide aus
(i) einer hochkonservierten Region des *pol*-Gens von HIV,
dargestellt durch eine der in SEQ ID NO: 4, 5 oder 9
angegebenen Sequenzen,
(ii) einer entsprechenden Region eines anderen HI-Virusisolats,
(iii) einer entsprechenden Region einer aus mehreren HI-
Virusisolaten stammenden Konsensussequenz,
oder dazu komplementären Sequenzen umfaßt.

M 12-05-00

SEQUENZPROTOKOLL

<110> Roche Diagnostics GmbH

<120> Neue Primer und Sonden zum Nachweis von HIV

<130> 18657pwomd

<140> PCT/EP99/08211

<141> 1999-10-29

<150> DE 19850186.2

<151> 1998-10-30

<160> 25

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 62

<212> DNA

<213> HIV

<400> 1

agggAACCCA CTGCTTAAGC CTCATAAAAG CTTGCCTTGA GTGCTTCAAG TAGTGTGTGC 60
62
CC

<210> 2

<211> 62

<212> DNA

<213> HIV

<400> 2

TTTGACTAGC GGAGGCTAGA AGGAGAGAGA TGGGTGCGAG AGCGTCAGTA TTAAGCGGGG 60
62
GA

<210> 3

<211> 62

<212> DNA

<213> HIV

<400> 3

ATTTAAAG CATTGGGACC AGCGGCTACA CTAGAAGAAA TGATGACAGC ATGTCAGGGA 60
62
GT

<210> 4
<211> 54
<212> DNA
<213> HIV

<400> 4
ctaaaggaag ctctattaga tacaggagca gatgatacag tattagaaga aatg 54

<210> 5
<211> 59
<212> DNA
<213> HIV

<400> 5
tggaaaccaa aatgatagg gggatttggaa gtttatca aagtaagaca gtatgatca 59

<210> 6
<211> 65
<212> DNA
<213> HIV

<400> 6
actgtaccag taaaattaaa gccaggaatg gatggcccaa aagttaaaca atggccattg 60
acaga 65

<210> 7
<211> 53
<212> DNA
<213> HIV

<400> 7
caatacatgg atgatttgtatgttagatct gacttagaaa tagggcagca tag 53

<210> 8
<211> 77
<212> DNA
<213> HIV

<400> 8
aaggaaaagg tctatctggc atgggtacca gcacacaaag gaattggagg aatgaacaa 60
gtagataaat tagtcag 77

<210> 9

M 12-05-00

> <211> 67
<212> DNA
<213> HIV

<400> 9
aaatagtagc cagctgtat aaatgtcagc taaaaggaga agccatgcat ggacaagtag 60
actgttag 67

<210> 10
<211> 59
<212> DNA
<213> HIV

<400> 10
caggaatttg gaattcccta caatccccaa agtcaaggag tagtagaattc tatgaataa 59

<210> 11
<211> 101
<212> DNA
<213> HIV

<400> 11
aaaattcaaa attttcgggt ttattacagg gacagcagaa atccactttg gaaaggacca 60
gcaaagctcc tctggaaagg tgaaggggca gtagtaatac a 101

<210> 12
<211> 62
<212> DNA
<213> HIV

<400> 12
agggattatg gaaaacagat ggcaggtat gattgtgtgg caagtagaca ggatgaggat 60
ta 62

<210> 13
<211> 97
<212> DNA
<213> HIV

<400> 13
tggcaactag attgtacaca tttagaagga aaagttatcc tggtagcagt tcattgttagcc 60
agtggatata tagaaggaga agttattcca gcagaaa 97

<210> 14
<211> 20
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer GH
A2F

<400> 14
tacctggcat gggtaaccaggc

20

<210> 15
<211> 26
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer GH
A2R

<400> 15
gactaattta tctacttggtt catttc

26

<210> 16
<211> 18
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer GH
A2P

<400> 16
cacacaaaagg aattggag

18

<210> 17
<211> 20
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer GH
A3F

M 12-05-00

<400> 17 20
tttggaaattc cctacaatcc

<210> 18
<211> 26
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer GH
A3R

<400> 18 26
aattctttat tcatacgattc tactac

<210> 19
<211> 15
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer GH
A3P

<400> 19 15
cccaaagtca aggag

<210> 20
<211> 24
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer GH
A4F

<400> 20 24
tcaaaatttt cgggtttatt acag

<210> 21
<211> 20
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer GH
A4R

<400> 21
agctttgctg gtcctttcca

20

<210> 22
<211> 19
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer GH
A4P

<400> 22
ggacagcaga aatccactt

19

<210> 23
<211> 26
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer GH
A6F

<400> 23
gcaactagat tgtacacatt tagaag

26

<210> 24
<211> 25
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer GH
A6R

<400> 24
cttctatata tccactggct acatg

25

<210> 25

M 12-05-00

<211> 23

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

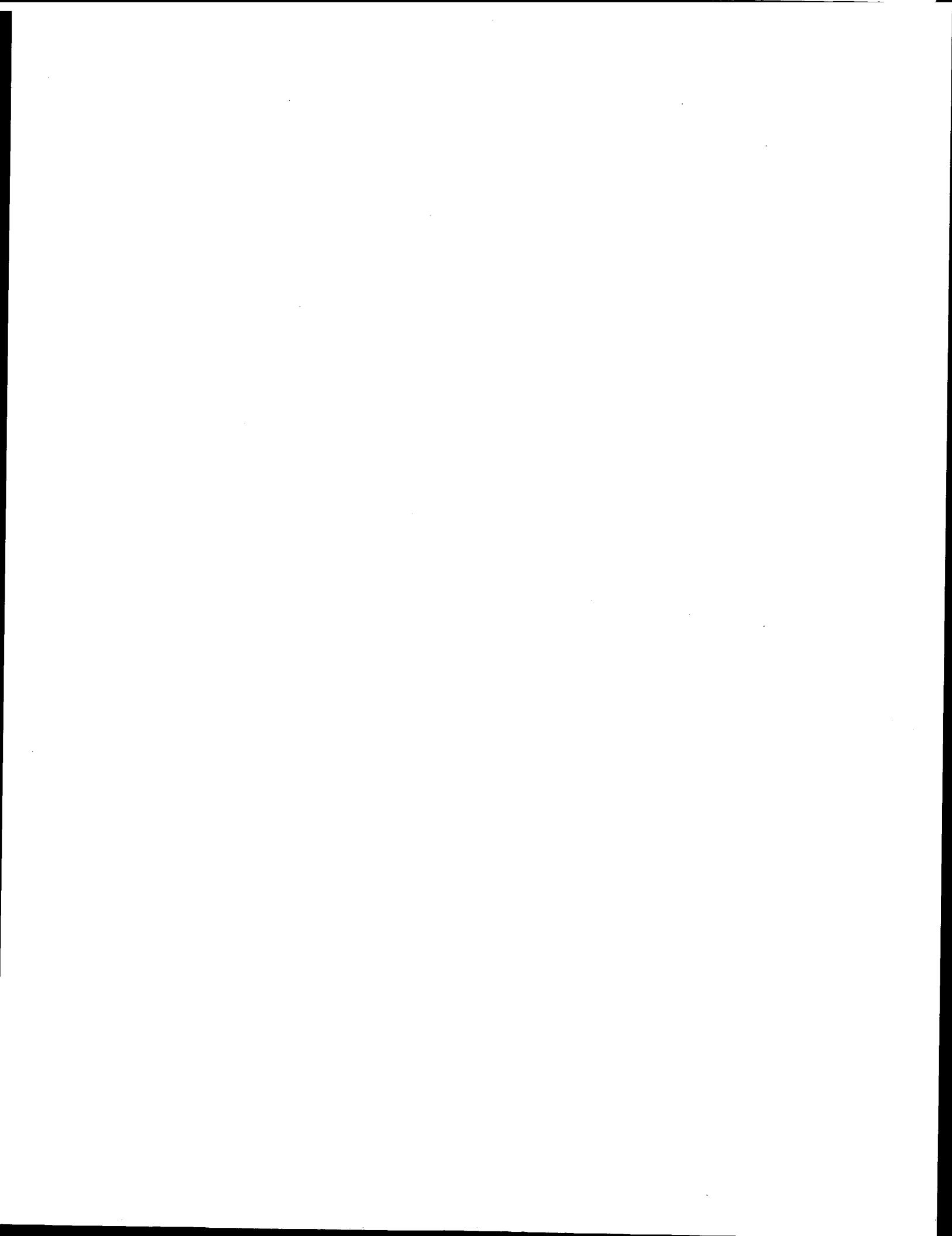
<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer GH
A6P

<400> 25

gaaaaagttat cctggtagca gtt

23



Translation
S060

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference 18657P WO	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/EP99/08211	International filing date (day/month/year) 29 October 1999 (29.10.99)	Priority date (day/month/year) 30 October 1998 (30.10.98)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12Q 1/70		
Applicant ROCHE DIAGNOSTICS GMBH		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
2. This REPORT consists of a total of <u>11</u> sheets, including this cover sheet.
<input checked="" type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).
These annexes consist of a total of <u>8</u> sheets.
3. This report contains indications relating to the following items:
I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report
II <input type="checkbox"/> Priority
III <input checked="" type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
IV <input checked="" type="checkbox"/> Lack of unity of invention
V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
VI <input checked="" type="checkbox"/> Certain documents cited
VII <input type="checkbox"/> Certain defects in the international application
VIII <input checked="" type="checkbox"/> Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 18 April 2000 (18.04.00)	Date of completion of this report 05 January 2001 (05.01.2001)
Name and mailing address of the IPEA/EP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

I. Basis of the report

1. With regard to the elements of the international application:*

the international application as originally filed
 the description:

pages _____ 1-21 _____, as originally filed
 pages _____ _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____

the claims:

pages _____ 1-12,15-21 _____, as originally filed
 pages _____, as amended (together with any statement under Article 19
 pages _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____

the drawings:

pages _____ 1-12,15-21 _____, as originally filed
 pages _____, filed with the demand
 pages _____ 13,14 _____, filed with the letter of 28 November 2000 (28.11.2000)

the sequence listing part of the description:

pages _____, as originally filed
 pages _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____

2. With regard to the language, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:

the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
 the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
 the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

contained in the international application in written form.
 filed together with the international application in computer readable form.
 furnished subsequently to this Authority in written form.
 furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
 The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
 The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. The amendments have resulted in the cancellation of:

the description, pages _____
 the claims, Nos. _____
 the drawings, sheets/fig _____

5. This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).**

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

** Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP99/08211

III. Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

1. The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of:

the entire international application.

claims Nos. 4-10

because:

the said international application, or the said claims Nos. _____ relate to the following subject matter which does not require an international preliminary examination (specify):

the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. 4-7,9 are so unclear that no meaningful opinion could be formed (specify):

See supplemental sheet

the claims, or said claims Nos. 6-10 are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion could be formed.

no international search report has been established for said claims Nos. _____

2. A meaningful international preliminary examination cannot be carried out due to the failure of the nucleotide and/or amino acid sequence listing to comply with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions:

the written form has not been furnished or does not comply with the standard.

the computer readable form has not been furnished or does not comply with the standard.

IV. Lack of unity of invention

1. In response to the invitation to restrict or pay additional fees the applicant has:

- restricted the claims.
- paid additional fees.
- paid additional fees under protest.
- neither restricted nor paid additional fees.

2. This Authority found that the requirement of unity of invention is not complied with and chose, according to Rule 68.1, not to invite the applicant to restrict or pay additional fees.

3. This Authority considers that the requirement of unity of invention in accordance with Rules 13.1, 13.2 and 13.3 is

- complied with.
- not complied with for the following reasons:

See supplemental sheet

4. Consequently, the following parts of the international application were the subject of international preliminary examination in establishing this report:

- all parts.
- the parts relating to claims Nos. _____

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP 99/08211

I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of (*Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.*):

Continuation of: Box I.6

The International Examining Authority is unable to compare the sequences filed with the letter of 12 May 2000 with those originally filed and the present examination report is therefore based on the sequences in the application as filed (pages 22-27).

Supplemental Box

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: III.1

1. The number of subtypes detected in a process depends on the conditions applied during the process. Therefore, the choice of oligonucleotides cannot be clearly specified on the basis of the subtypes that may be detected. The applicant argues that a person skilled in the art could establish whether a process detects a subtype simply by sequence comparisons. However, the Examining Authority considers that the fundamental problem - i.e., that the process cannot be clearly specified by its objective, since successful detection depends on many factors unspecified in the claims - is not thereby eliminated. Claims 4-5, 7 and 9 cannot, therefore, be examined owing to lack of clarity.
2. The choice of oligonucleotides is also specified on the basis of the ultimate objective in Claim 6. The fact that the oligonucleotides as a whole permit subtype- and/or species-specific detection of HIV provides little, if any, information on the subtype-specific oligonucleotides to be used, since it is not clear how many subtypes must be detected. Therefore, Claim 6 must also remain unexamined owing to lack of clarity.
3. The description gives no indication of how the species-specific primers used in the process as per Claims 6-10 are selected. Therefore, the claims cannot be examined owing to lack of support in the description.

Supplemental Box

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: IV.3

1. Since preserved regions in the HIV genome are known from the prior art - specifically, D1-D6 and D11 - the oligonucleotide sequences mentioned in Claims 13-15 appear to posses no common features that could represent a common inventive concept.

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-3, 11-12, 16, 18-19	YES
	Claims	13-15, 17, 20-21	NO
Inventive step (IS)	Claims		YES
	Claims	1-3, 11-21	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-3, 11-21	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

NOVELTY:

1. The following documents are prejudicial to the novelty of Claims 13-15, 17 and 20-21. The applicant has modified Claims 13 and 14 in such a way that the claimed oligonucleotides must, over a fragment of between 15 and 30 nucleotides, be identical with a fragment represented by a sequence in SEQ ID NO: 4, 5, 9 or 10. However, this is not sufficient to delimit the subject matter of the application over oligonucleotides which coincide over a fragment of more than 30 nucleotides with the indicated sequences.

D7: WO 98/44945

D7 describes a mutated HIV strain, L2, with an inactivated protease. However, 36 nucleotides in the sequence of the known LAI strain shown in SEQ ID NO: 1 overlap with SEQ ID NO: 4 in the present application. **Claims 13 and 14** are therefore not novel over D7.

D8: WO 92/15708

D8 describes a process for improving sensitivity. As an example of an HIV probe, Probe 839 (see Table

1) is used. This probe overlaps with SEQ ID NO: 10 over a fragment of 31 nucleotides. The disclaimer in Claim 13 corresponds partially to Probe 839, but the last eight nucleotides in the disclaimer sequence are not comprised by Probe 839, which is therefore prejudicial to the novelty of **Claims 13 and 17**.

D10: WO 96/02557

D10 describes oligonucleotides for inhibiting HIV-1 growth or for detecting HIV-1. SEQ ID NO: 2 overlaps with the entire sequence SEQ ID NO: 16 in the present application. **Claim 15** is therefore not novel.

D11: EP-A-0 229 701

D11 describes a process for detecting HIV using a primer that binds to a preserved region (see page 3, line 50). Probe SK34, which is used in Example 5 to detect HIV without first culturing the virus, overlaps with SEQ ID NO: 9 in the present application over a fragment of 34 nucleotides and is therefore prejudicial to the novelty of **Claims 13-14 and 20-21**.

D12: EMBL Database, Entry AGPROTF3, Accession number**M24551 (1989)**

D12 describes a gene coding for a synthetic HIV-1 protease, of which 58 nucleotides overlap with SEQ ID NO: 5. **Claims 13 and 14** are therefore not novel over D12.

INVENTIVE STEP:

2. Claims 1 and 18-19 differ from D11 only in that at least two oligonucleotides are used, which comprise

10-80 nucleotides from the same highly preserved region represented by one of the sequences SEQ ID NO: 1-13. However, the Examining Authority considers that the use of two oligonucleotides which bind to a preserved region would be an obvious step to a person skilled in the art in order to amplify a preserved region using PCR techniques.

The applicant argues that the primers that amplify SEQ ID NO: 8, 10, 11 and 13 (see the table in the application) exhibit improved sensitivity compared with the primers described in D11. However, the Examining Authority considers that this example is not sufficient to represent improved, subtype-comprehensive detection. The example is based on a single isolate of an HIV strain and therefore cannot demonstrate the subtype-comprehensive similarities of the sequences (SEQ ID NOS.: 1-13) (see also Box VIII).

It is therefore unclear whether the problem indicated in the description is solved by the subject matter of Claims 1 and 18-19 and it has certainly not been demonstrated that an objective problem is solved in light of D11. Claims 1 and 18-19 are therefore not considered to involve an inventive step.

3. All the following citations (D1-D6) describe processes that have precisely the same objective as the process according to Claim 1: that is, the subtype- and/or species-comprehensive detection of HIV.

D1: EP-A-0 854 197

D1 describes **gag** primers that enable simultaneous amplification of all subtypes of HIV-1 group M.

D2: EP-A-0 727 497

D2 describes **pol** primers that enable detection of all HIV-1 subtypes.

D3: EP-A-0 617 132

D3 describes HIV probes that enable the specific detection of HIV-1 in the presence of similar viruses.

D4: EP-A-0 516 540

D4 describes the use of oligonucleotides that are present in all HIVs. The indicated regions differ from those shown in the present application.

D5: EP-A-0 839 917

D5 describes probes from the 3' end of the **gag** gene that enable a significantly larger number of subtypes to be detected compared with previous probes.

D6: EP-A-0 806 484

D6 describes probes that bind to HIV-1 and related viruses (HIV-2 and SIV).

The subject matter of Claims 1 and 18-19 differs from this prior art only in the oligonucleotides used. To a person skilled in the art the selection of other preserved oligonucleotides to detect HIV would be obvious. Inventive step could therefore only be acknowledged if the applicant proved that the oligonucleotides used in the claimed process

produced advantages relative to subtype-comprehensive detection and thus solved a technical problem. However, as explained above, the application contains no such evidence and therefore Claims 1 and 18-19 are also considered to lack an inventive step in light of D1-D6.

4. Claims 2, 3 and 12 concern features routinely used in the prior art and are therefore not considered to involve an inventive step.
5. Since the oligonucleotides in D10, which comprise at least portions of the sequences SEQ ID NO: 14 and 16, are used to detect HIV, a person skilled in the art would arrive at the subject matter of Claim 11 by combining the teaching of D10 with that of D11 or D1-D6. Therefore, Claim 11 is not considered to involve an inventive step.
6. Identification of oligonucleotides that yield few mismatches with the various HIV subtypes is obvious to a person skilled in the art and since this, according to the applicant's reply, may readily be accomplished by sequence comparisons, the subject matter of Claim 16 does not appear to involve an inventive step.

INDUSTRIAL APPLICABILITY:

7. The entire claimed subject matter appears to be industrially applicable.

P DOCUMENTS:

8. J. Clin. Microbiol., Vol. 37(6), pages 1813-1818 (June 1999)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP 99/08211

This document was published after the priority date but before the filing date of the present application. It is therefore relevant only to the examination of claimed subjects in the present application which lack a valid priority claim.

Supplemental Box

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: VI.2

The priority of these documents has not been examined.

The above-indicated documents were published after the priority date but before the filing date of the present application. They are therefore relevant only to examination of claimed subjects in the present application which do not enjoy a valid priority claim.

However, in the regional phase these documents could also become important in examination of the novelty of the entire application.

VIII. Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

1. The definition of oligonucleotides in Claim 1 is unclear, since the expression "[from] a corresponding region" is unclear. The description (page 11, paragraph 2) states that sequences in the preserved regions are not restricted to a single sequence. However, it is not clear to a person skilled in the art how widely a sequence of an HIV isolate may diverge from the sequences in SEQ ID NO:1-13 while remaining applicable in the claimed process. Claim 1 is therefore considered unclear.

2. In the example given in the present application higher specificity compared with prior art primers is achieved by amplification with primers that amplify sequences SEQ ID NOS: 8, 11 and 13. However, this HIV-1 specificity is something quite different from a subtype- and/or species-comprehensive process. The application provides no evidence that a subtype- and/or species-comprehensive process using primers is possible with the sequences SEQ ID NOS: 1-13.

Phenylalanyl-tRNA Synthetase Interacts with DNA: Studies on Activity Using Deoxyribooligonucleotides

K. A. Ivanov^{*}, N. A. Moor, V. N. Ankilova, and O. I. Lavrik

Novosibirsk Institute of Bioorganic Chemistry, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, pr. Lavrent'eva 8, Novosibirsk, 630090 Russia; fax: (8-3832) 33-3677; E-mail: ivkon@niboch.nsc.ru

^{*} To whom correspondence should be addressed.

Received February 26, 1999; Revision received July 29, 1999

Phenylalanyl-tRNA synthetase from *Thermus thermophilus* complexes with short (up to 30 nucleotide length) single-stranded DNA fragments more efficiently than with double-stranded fragments. The complexing between DNA and the protein significantly increases with deoxyribooligonucleotide longer than 20 nucleotides. Using affinity labeling, the binding site of DNA was located near the interface of the *alpha*- and *beta*-subunits. The binding sites of DNA and tRNA^{Phe} do not overlap. Phenylalanyl-tRNA synthetase from *E. coli* also binds DNA.

KEY WORDS: affinity labeling, aminoacyl-tRNA synthetases, *Thermus thermophilus*



PCTWELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁷ : C12Q 1/68		A2	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/29611
			(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 25. Mai 2000 (25.05.00)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP99/08211		(81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).	
(22) Internationales Anmeldedatum: 29. Oktober 1999 (29.10.99)		Veröffentlicht <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>	
(30) Prioritätsdaten: 198 50 186.2 30. Oktober 1998 (30.10.98) DE			
(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): ROCHE DIAGNOSTICS GMBH [DE/DE]; Sandhofer Strasse 112 – 132, D-68305 Mannheim (DE).			
(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): HABERHAUSEN, Gerd [DE/DE]; Jochbergweg 2, D-82393 Iffeldorf (DE). KASPER, Pia [DE/DE]; Sandhofer Strasse 13 a, D-68305 Mannheim (DE). KESSLER, Christoph [DE/DE]; Schlossbergweg 11, D-82057 Icking (DE).			
(74) Anwälte: WEICKMANN, H. usw.; Kopernikusstrasse 9, D-81679 München (DE).			

(54) Title: NOVEL PRIMERS AND PROBES FOR DETECTING HIV

(54) Bezeichnung: NEUE PRIMER UND SONDEN ZUM NACHWEIS VON HIV

(57) Abstract

The invention relates to a method for the subtype and/or species-comprehensive detection of HI viruses in a sample while using at least one oligonucleotide which contains at least 10 successive nucleotides from (i) a highly preserved region of the LTR region, of the *gag* gene or of the *pol* gene of HIV, (ii) of a corresponding region of another HI virus isolate, (iii) of a corresponding region of a consensus sequence stemming from a plurality of HI virus isolates or of sequences complementary thereto.

(57) Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum subtyp- und/oder speziesübergreifenden Nachweis von HI-Viren in einer Probe unter Verwendung mindestens eines Oligonukleotids, welches mindestens 10 aufeinanderfolgende Nukleotide aus (i) einer hochkonservierten Region der LTR-Region, des *gag*-Gens oder des *pol*-Gens von HIV, (ii) einer entsprechenden Region eines anderen HI-Virusisolats, (iii) einer entsprechenden Region einer aus mehreren HI-Virusisolaten stammenden Konsensussequenz, oder dazu komplementären Sequenzen enthält.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

Neue Primer und Sonden zum Nachweis von HIV

Beschreibung

5 Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum subtyp- oder/und speziesübergreifenden Nachweis von HI-Viren in einer Probe sowie dazu geeignete Oligonukleotide.

10 Der Nachweis von HIV ist von großer Bedeutung in der analytischen Diagnostik. Es existiert eine Anzahl von Nachweisverfahren, die auf der immunologischen Detektion von HIV-spezifischen Antikörpern, HIV-eigenen Proteinen, beispielsweise der Reversen Transkriptase, oder von HIV-spezifischen Nukleinsäuren beruhen.

15 Da HIV und dessen genetisches Material nur in sehr geringen Konzentrationen in Körperflüssigkeiten vorkommen, ist die Sensitivität der Nachweisverfahren ein wichtiger Faktor für die Verwendbarkeit solcher Verfahren.

20 Aus diesem Grund wird derzeit die PCR (Polymerase Chain Reaction), die auf einer Amplifikation der nachzuweisenden Nukleinsäuren beruht, in zunehmendem Maße verwendet. Anwendungen dieses Verfahrens zum direkten Nachweis von HIV sind beispielsweise in EP-B-0 200 362 und EP-25 B-0 201 184 beschrieben.

30 Die PCR oder Polymerase-Kettenreaktion erlaubt die Amplifikation von Nukleinsäureabschnitten mit Hilfe von Oligonukleotiden, sogenannten Primern, die spezifisch mit den nachzuweisenden Nukleinsäuren hybridisieren. Dabei entstehen Amplifikationsprodukte, welche wiederum mit weiteren spezifischen Oligonukleotiden, sogenannten Sonden, detektiert werden können.

Voraussetzungen für eine erfolgreiche PCR zum Nachweis von HIV ist einerseits eine möglichst genaue Übereinstimmung der komplementären Basenfolge der verwendeten Primer mit derjenigen der nachzuweisenden Nukleinsäure, damit die Hybridisierung möglichst spezifisch ist. Andererseits 5 ist es jedoch auch vorteilhaft, möglichst viele Varianten von HIV mit denselben Primern amplifizieren zu können.

Seit der Entdeckung des HIV-1 wurde festgestellt, dass die Nukleinsäuresequenzen von HI-Viren unterschiedlicher Provenienz sich 10 unterscheiden. Die unterschiedlichen Typen von HIV-1 werden üblicherweise als Subtypen bezeichnet. Derzeit sind mindestens 9 Subtypen bekannt, die als Subtypen A bis H und O bezeichnet werden (Human Retroviruses and AIDS, Los Alamos, Natl. Laboratory, Los Alamos, New Mexico, 1994; Herausgeber G. Meyers et al., I-A-1). Bisher wurden noch 15 keine Primer oder Sonden entwickelt, mit denen sämtliche bekannten Subtypen von HIV-1 erkannt werden können. Weiterhin wäre es von Vorteil, zusätzlich auch HIV-2 und dessen Subtypen mit denselben Primern und Sonden erkennen zu können. Von HIV-2 sind derzeit die Subtypen A,B,C und D bekannt.

20 In einigen Patentanmeldungen werden Oligonukleotidprimer und/oder Sonden offenbart, die jedoch nicht von der vorliegenden Anmeldung umfaßt werden.

25 WO96/02557 beschreibt allgemeine Verwendungen von Oligonukleotiden zur Hemmung der HIV-Propagierung und zum Nachweis des Virus. Hinweise auf eine Eignung für einen spezies- oder subtypübergreifenden Nachweis finden sich allerdings nicht.

30 In der europäischen Patentanmeldung EP 0 403 333 werden Primer und Sonden beschrieben, die jeweils mit Basensequenzen aus konservierten Regionen der *gag*-,*vpr*- und *pol*-Gene der HIV-1-Isolate Bru, Mal und Eli

- 3 -

sowie mit den entsprechenden Regionen von HIV-2 ROD und SIV Mac hybridisieren. Weiterhin werden Primer und Sonden offenbart, die jeweils mit Abschnitten aus den *env*-, *nef1*-, *vif1*- und *vpr*-Genen von HIV-1 Bru, Mal und Eli hybridisieren, sowie solche, die mit Abschnitten aus den *nef2*-, 5 *vif2*- und *vpx*-Genen von HIV-2 ROD und SIV Mac hybridisieren. Obwohl einige dieser Oligonukleotide offenbar speziesübergreifend hybridisieren, ist nichts darüber ausgesagt, welche Subtypen der einzelnen Viren erkannt werden.

10 Weitere Nachweisverfahren für HIV offenbaren z.B. EP 839 917, bei der jedoch nur Subtypen von HIV-1 nachgewiesen werden können, sowie die nachveröffentlichten Anmeldungen EP 887 427, WO99/07898 und WO98/58086. In der europäischen Patentanmeldung EP 727 497 sind Primer und Sonden offenbart, die einen Sequenzabschnitt aus dem *pol*-Gen 15 von HIV-1 amplifizieren und dadurch fünf Subtypen von HIV-1 erkennen können.

EP 0 617 132 offenbart ebenfalls Primer und Sonden zum Nachweis von HIV-1, die in der Lage sind, zwischen HIV-1 und seinen phylogenetisch 20 nächsten Verwandten zu unterscheiden, wie etwa HTLV-II oder HIV-2. Die dort ausgewählten Oligonukleotide hybridisieren mit einer Reihe von Regionen aus dem HIV-Genom, einschließlich des LTR und der meisten Strukturgene. Hinweise auf eine Eignung für einen subtypübergreifenden Nachweis finden sich allerdings nicht.

25 Weiterhin gibt es im Stand der Technik Verfahren, welche Oligonukleotide für eine Aufreinigung mittels Hybridisierung mit Zieloligos verwenden, z.B. WO98/27425. Solche Oligos sind für einen subtypübergreifenden Nachweis von HIV allerdings nicht geeignet.

30 WO90/01069 offenbart zwar Oligonukleotidpaare zum Nachweis von HIV, jedoch werden diese Paare nicht als Primer für eine enzymatische

Amplifikation verwendet, sondern sie hybridisieren am selben Strang und stellen selbst nach ihrer Verknüpfung die gesuchte Sequenz dar.

Da es bisher noch kein einziges Primerpaar gibt, welches für einen subtyp- oder/und speziesübergreifenden Nachweis geeignet ist, werden derzeit häufig mehrere Primerpaare zur Amplifikation eingesetzt. Dies führt jedoch einerseits zu erhöhten Reagenzkosten und andererseits zu einer erheblich komplexeren PCR.

10 Aufgabe der vorliegenden Erfindung war daher die Bereitstellung eines Verfahrens zum subtyp- oder/und speziesübergreifenden Nachweis von HI-Viren in einer Probe. Insbesondere war es eine Aufgabe der Erfindung, ein Verfahren bereitzustellen, mit dem mehr Subtypen von HIV-1 und/oder HIV-2 detektiert werden können, als es bisher möglich war.

15 Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß gelöst durch ein Verfahren zum subtyp- und/oder speziesübergreifenden Nachweis von Nukleinsäuren von HI-Viren in einer Probe durch

20 Hybridisierung der Nukleinsäuren mit mindestens einem mit HIV-Nukleinsäuren spezifisch hybridisierenden Oligonukleotid, welches mindestens 10 aufeinanderfolgende Nukleotide aus

25 (i) einer hochkonservierten Region der LTR-Region, des *gag*-Gens oder des *pol*-Gens von HIV, dargestellt durch eine der in SEQ ID NO: 1 bis 13 angegebenen Sequenzen,
(ii) einer entsprechenden Region eines anderen HI-Virusisolats,
(iii) einer entsprechenden Region einer Konsensussequenz aus mehreren HI-Virusisolaten,
oder dazu komplementären Sequenzen enthält.

30 Bevorzugt wird diese Aufgabe gelöst durch ein Verfahren zum subtyp- und/oder speziesübergreifenden Nachweis von Nukleinsäuren von HI-Viren in einer Probe durch

- 5 -

Hybridisierung der Nukleinsäuren mit einer Oligonukleotidkombination, umfassend zwei oder mehr mit HIV-Nukleinsäuren spezifisch hybridisierende Oligonukleotide, die jeweils mindestens 10 aufeinanderfolgende Nukleotide aus

5 (i) einer hochkonservierten Region der LTR-Region, des *gag*-Gens oder des *pol*-Gens von HIV, dargestellt durch eine der in SEQ ID NO: 1 bis 13 angegebenen Sequenzen,

10 (ii) einer entsprechenden Region eines anderen HI-Virusisolats,

(iii) einer entsprechenden Region einer aus mehreren HI-Virusisolaten abgeleiteten Konsensussequenz,
oder dazu komplementären Sequenzen enthalten, und Durchführung eines Amplifikationsschrittes.

Das erfindungsgemäße Verfahren ermöglicht den Nachweis von mehr 15 Subtypen von HIV-1 und HIV-2 (subtypübergreifender Nachweis) als es im bisherigen Stand der Technik möglich war. Der subtypübergreifende Nachweis bedeutet, daß mindestens 2 Subtypen einer jeweiligen Spezies mit einer einzigen Sonde oder einer einzigen Oligonukleotidkombination detektiert werden können. Wie bereits oben erwähnt, ist es bisher nicht 20 möglich gewesen, mit herkömmlichen Nachweisverfahren die Subtypen A, B, C, D, E, F, G, H und O von HIV-1 mit einer einzigen Sonde oder einem einzigen Amplifikationsprimerpaar bestehend aus zwei Oligonukleotiden zu detektieren. Durch das erfindungsgemäße Verfahren wird es nun möglich, 25 mindestens 7 von 9 Subtypen von HIV-1, insbesondere einschließlich Subtyp O in Verbindung mit anderen Subtypen mit Hilfe besonders weniger und im besten Fall mit denselben Oligonukleotiden zu erkennen. In einer bevorzugten Ausführungsform können alle bisher bekannten 9 Subtypen erkannt werden. Von HIV-2 können mit dem subtypübergreifenden Nachweis mindestens 2, bevorzugt mindestens 3 und am meisten bevorzugt 30 alle Subtypen A, B, C und D von HIV-2 erkannt werden. Zusätzlich zum subtypübergreifenden Nachweis können auch Nukleinsäuren von HIV-1 und HIV-2 speziesübergreifend detektiert werden. Speziesübergreifend bedeutet,

- 6 -

daß verschiedene Spezies von Immunodefizienzviren mit denselben Oligonukleotiden erkannt werden, z.B. HIV-1 und HIV-2. Bevorzugt werden mindestens 7 der derzeit bekannten 9 Subtypen von HIV-1, sowie weitere der derzeit bekannten Subtypen von HIV-2 detektiert. Besonders bevorzugt können alle 9 Subtypen von HIV-1 plus weitere Subtypen von HIV-2, besonders bevorzugt plus alle derzeit bekannten Subtypen von HIV-2 detektiert werden.

Das erfindungsgemäße Verfahren beruht auf einer Amplifikation von Nukleinsäureabschnitten von HI-Viren mit Hilfe von spezifischen Oligonukleotiden, die als Primer oder als Sonden fungieren können.

Ein Oligonukleotid ist ein einsträngiges lineares Nukleinsäuremolekül. Im Allgemeinen weisen Oligonukleotide 10 bis 100 Basen auf. Die erfindungsgemäßen Oligonukleotide sind bevorzugt 10 bis 80, besonders bevorzugt 10 bis 60, noch stärker bevorzugt 10 bis 30 und am meisten bevorzugt 20 bis 30 Nukleotide lang. Wie bei Nukleinsäuren unterscheidet man auch hier zwischen Oligodesoxyribonukleotiden und Oligoribonukleotiden, zu den Oligoribonukleotiden zählt man jedoch auch Verbindungen, bei denen der Wasserstoff der Hydroxygruppe durch organische Reste, beispielsweise eine Allylgruppe, ersetzt ist. Solche Verbindungen sind dem Fachmann seit längerem bekannt. Weiterhin können durch den Begriff "Oligonukleotid" beispielsweise auch Moleküle umfaßt sein, bei denen das Zuckerphosphatrückgrat durch ein Peptidrückgrat ersetzt ist. Diese Gruppe von Verbindungen wird PNA genannt. Allen Oligonukleotiden ist gemeinsam, dass sie am Rückgrat Basen aufweisen, welche zu Wasserstoffbrückenbindungen mit hierzu komplementären Basen in der Lage sind. Zu den Basen gehören die natürlichen Basen A, G, C, T und U, jedoch auch künstliche Basen, wie etwa Deaza-G.

30

Ein Oligonukleotidprimer ist ein Oligonukleotid, welches mit einer zweiten, ebenfalls einsträngigen Nukleinsäure hybridisieren kann und anschließend

- 7 -

durch ein geeignetes Enzym, z.B. eine DNA-Polymerase entlang der als Matrizedienenden zweiten Nukleinsäure mit Nukleosidtriphosphaten ergänzt werden kann, sodass eine doppelsträngige Nukleinsäure entsteht. Normalerweise besitzt der Primer daher an seinem 3'-Ende, d.h. an dem Ende, an dem Nukleotidbausteine angesetzt werden, am 3'-C-Atom des Zuckers eine Hydroxylgruppe.

5 Eine Oligonukleotidkombination umfaßt mehrere Oligonukleotide, bevorzugt umfaßt sie ein Primerpaar oder eine Kombination aus Primern und Sonden, wie etwa ein Primerpaar und eine Sonde. Ein Primerpaar besteht aus zwei 10 Oligonukleotidprimern, welche die bevorzugt enzymatische Amplifikation eines bestimmten Abschnittes einer Nukleinsäure erlauben. Bevorzugt hybridisieren die beiden Primer des Primerpaars mit unterschiedlichen 15 Strängen der Ursprungsnukleinsäure dergestalt, dass die jeweiligen Verlängerungsprodukte einander überlappen. Dies führt dann dazu, dass jeder der Primer mit dem Verlängerungsprodukt des jeweils anderen Primers 20 hybridisieren kann und ein Abschnitt, der zwischen den beiden Primern liegt, als Amplifikationsprodukt vervielfacht wird. Sogenannte Sonden sind ebenfalls einsträngige Oligonukleotide, die zwar auch als Primer fungieren können, aber hauptsächlich dafür vorgesehen sind, mit bereits amplifizierten 25 Nukleinsäureabschnitten spezifisch zu hybridisieren, um somit einen Nukleinsäurenachweis zu ermöglichen. Die Bezeichnung "Oligonukleotid" umfasst somit die Begriffe Primer und Sonde, die sich lediglich ihrer Funktion nach unterscheiden. Die im erfindungsgemäßen Verfahren verwendeten Oligonukleotide können auch Markierungsgruppen enthalten, wie etwa radioaktive Marker oder Fluoreszenzmarker. Insbesondere sind es 30 die Sonden, die Markierungen aufweisen.

Unter Amplifikation wird die Vervielfältigung von Nukleinsäuren oder 30 Nukleinsäureabschnitten verstanden. Einbekanntes Amplifikationsverfahren ist die eingangs erwähnte PCR. Bei diesem Verfahren wird zunächst ein normalerweise doppelsträngiges DNA-Molekül denaturiert, d.h. in seine

Einzelstränge aufgespalten. Dann werden die Amplifikationsprimer unter Bedingungen hinzugegeben, die eine Hybridisierung der Primer mit der Ziel-DNA-Sequenz erlauben. Mit Hilfe eines Polymeraseenzyms sowie Nukleotidbausteinen werden dann die Primer entlang der Nukleinsäurematrize ergänzt. Anschließend werden die neugebildeten doppelsträngigen Nukleinsäuren wieder denaturiert und es beginnt ein neuer Polymerasezyklus. Herkömmliche PCR-Verfahren verwenden typischerweise zwischen 25 und 40 Zyklen. Eine Amplifikation im Sinne der Erfindung kann also auch nötige Vorbereitungsschritte zur Nukleinsäureamplifikation miteinschließen, wie z.B. das Denaturieren der doppelsträngigen DNA.

Der Begriff "Hybridisierung" bedeutet hierin die Vereinigung zweier komplementärer Nukleinsäureeinzelstränge zu einem Doppelstrang. Dazu müssen die Einzelstränge nicht 100 % komplementär sein, sondern können Abweichungen in der Basenfolge aufweisen. Um eine für das erfindungsgemäße Verfahren geeignete Hybridisierung zu erreichen, müssen die Einzelstränge, in diesem Fall die Oligonukleotide, unter den herrschenden Hybridisierungsbedingungen jedoch hinreichend spezifisch sein.

Um die eingangs genannten Vorteile des hier beschriebenen erfindungsgemäßen Verfahrens zu gewährleisten, müssen die verwendeten Oligonukleotide zumindest zwei Bedingungen erfüllen. Sie müssen einerseits spezifisch genug sein, um ausschließlich mit Nukleinsäuren zu hybridisieren, die von HI-Viren stammen. Andererseits variieren gerade diese Viren in einigen Genomregionen sehr stark, d.h. dass relativ große Unterschiede in der Basensequenz vorliegen. Aufgrund dieser Unterschiede unterscheidet man einerseits zwischen HIV-1 und HIV-2 als auch zwischen sogenannten Subtypen, die relativ eng verwandte Stämme desselben Virus darstellen. Bezogen auf die Oligonukleotide der vorliegenden Erfindung bedeutet dies, dass diese außerdem in der Lage sein müssen, nicht nur ein bestimmtes Virus oder einen bestimmten Subtyp zu erkennen, sondern sie müssen eine Basensequenz aufweisen, die eine Hybridisierung mit möglichst vielen oder

- 9 -

sogar allen bekannten Subtypen von HIV-1 oder von HIV-2 oder sogar von beiden erlaubt.

Zu diesem Zweck wählt man normalerweise die Oligonukleotide aus relativ 5 konservierten Regionen des Genoms der nachzuweisenden Viren aus und verwendet dann die jeweilige Komplementärsequenz. Aus dem Stand der Technik sind bereits einige hochkonservierte Regionen bekannt (siehe oben). Konservierte Regionen sind Nukleinsäureabschnitte auf dem Genom von HIV, die im Vergleich zum Rest des Genoms nur sehr geringe Unterschiede 10 in der Basensequenz aufweisen. In diesem Zusammenhang spricht man auch von Basenidentität, die in Prozent ausgedrückt wird, oder von Homologie.

Überraschenderweise wurden nun in der vorliegenden Erfindung 15 Oligonukleotide gefunden, die sowohl einen subtypübergreifenden Nachweis als auch einen speziesübergreifenden Nachweis von HIV ermöglichen. Diese Oligonukleotide hybridisieren mit neu entdeckten hochkonservierten Regionen von HIV. Diese befinden sich in der LTR-Region, dem *gag*- und dem *pol*-Gen. Diese Regionen sind relativ klein, sie erlauben mit einer 20 durchschnittlichen Länge von 50 bis 100 Nukleotiden jedoch die Hybridisierung mit einem oder mehreren Oligonukleotiden. Die Festlegung der Regionen des HIV-Genoms basiert hierin, wie auch in den meisten zitierten Dokumenten des Stands der Technik, auf der Nummerierung des 25 HIV-1-Isolats HXB2, wie veröffentlicht in: Wong-Staal et al., *Nature* 313, 277-284 (1985). Die Sequenzen dieser neuen hochkonservierten Bereiche sind jeweils in den SEQ ID NO. 1 bis 13 angegeben, deren Sequenzen sich auf die Sequenz von HIV-1 HXB2, Zugangsnummer K03455 der HIV Sequence Data Base (<http://HIV-web.lanl.gov/>) beziehen. Die Lage der hochkonservierten Sequenzen ist wie folgt:

30

SEQ ID NO. 1: LTR-Region, Position 504 - 565, Länge 62 Nukleotide

- 10 -

SEQ ID NO. 2: *gag*-Gen, Position 761 - 822, Länge 62 Nukleotide

SEQ ID NO. 3: *gag*-Gen, Position 1786 - 1847, Länge 62 Nukleotide

5 SEQ ID NO. 4: *pol*-Region, Position 2307 - 2360, Länge 54 Nukleotide

SEQ ID NO. 5: *pol*-Gen, Position 2376 - 2434, Länge 59 Nukleotide

SEQ ID NO. 6: *pol*-Gen, Position 2568 - 2632, Länge 65 Nukleotide

10

SEQ ID NO. 7: *pol*-Gen, Position 3093 - 3145, Länge 53 Nukleotide

SEQ ID NO. 8: *pol*-Gen, Position 4131 - 4207, Länge 77 Nukleotide

15

SEQ ID NO. 9: *pol*-Gen, Position 4333 - 4399, Länge 67 Nukleotide

SEQ ID NO. 10: *pol*-Gen, Position 4638 - 4696, Länge 59 Nukleotide

SEQ ID NO. 11: *pol*-Gen, Position 4884 - 4984, Länge 101 Nukleotide

20

SEQ ID NO. 12: *pol*-Gen, Position 5034 - 5095, Länge 62 Nukleotide

SEQ ID NO. 13: *pol*-Gen, Position 4410 - 4506, Länge 97 Nukleotide.

25

Die erfindungsgemäß geeigneten Oligonukleotide weisen bevorzugt Basensequenzen auf, die innerhalb der oben genannten hochkonservierten Regionen oder deren Komplementärsequenzen liegen.

30

Der Begriff "überlappen" soll hierin so verstanden werden, daß die erfindungsgemäßen Oligonukleotide jeweils mit mindestens 10 aufeinanderfolgenden Basen aus einer der hochkonservierten Regionen überlappen.

- 11 -

Bevorzugt überlappen die Oligonukleotide mit jeweils einer der Regionen mit den SEQ ID NO: 4, 5, 9, 10 und 13, bevorzugt 4, 5, 9 und 10. In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform überlappen die Oligonukleotide mit jeweils einer der Regionen mit den SEQ ID NO: 6, 8, 10, 11 und 13.

5

Obwohl die hochkonservierten Regionen in Bezug auf ein einziges HIV-1-Virusisolat angegeben sind, weist natürlich der Begriff "hochkonservierte Region" über eine einzige spezifische Sequenz hinaus und umfasst somit alle entsprechenden Regionen von verschiedenen HIV-Stämmen oder -Isolaten, 10 die mit HIV-1 oder mit HIV-2 verwandt sind. Erfindungsgemäß geeignete Oligonukleotidsequenzen können auch eine Basensequenz aufweisen, die eine Konsensussequenz aus hochkonservierten Regionen von mehreren HI-Virusisolaten oder -stämmen darstellt. D.h. dass beispielsweise eine Basenabfolge von mehreren Basen einem HI-Virusisolat entspricht und eine weitere Basenabfolge im selben Oligonukleotid einem anderen HI-Virusisolat entspricht. Das Oligonukleotid enthält dann heterologe Basenfolgen. Bevorzugt umfassen die Oligonukleotide jeweils mindestens 10 aufeinanderfolgende Nukleotide aus einer der zuvor genannten Regionen. 15 Stärker bevorzugt enthalten sie 15 bis 30 solcher Nukleotide.

20

Das erfindungsgemäße Verfahren umfasst mindestens die folgenden Schritte:

25

- (a) Inkontaktbringen einer Probe mit dem/den Oligonukleotid(en) unter Bedingungen, bei denen eine Hybridisierung des/der Oligonukleotide(s) mit in der Probe vorhandenen HIV-Nukleinsäuren, ausgewählt aus HIV-1 oder/und HIV-2, erfolgt,
- (b) Bestimmen des Vorhandenseins oder/und der Menge von HIV-Nukleinsäuren in der Probe.

30 In Schritt (b) wird bevorzugt ein Amplifikationsschritt durchgeführt.

In einer bevorzugten Ausführungsform des Verfahrens gemäß der Erfindung wird der subtyp- oder/und speziesübergreifende Nachweis von HIV-Virusnukleinsäuren dadurch ermöglicht, dass mindestens zwei erfindungsgemäße Oligonukleotide verwendet werden. Bevorzugt werden 5 diese Oligonukleotide als Amplifikationsprimer eingesetzt dergestalt, dass sie beispielsweise jeweils nahe an einem Ende einer der hochkonservierten Regionen hybridisieren und somit bei der Amplifikation (bevorzugt PCR) ein Amplifikationsprodukt erzeugen, welches einem Abschnitt der betreffenden hochkonservierten Region entspricht. Der Nachweis dieses 10 Amplifikationsproduktes und somit der HIV-spezifischen Nukleinsäure kann dann mit Hilfe einer Sonde erfolgen, die entweder eines der als Primer verwendeten Oligonukleotide ist oder ein zusätzliches Oligonukleotid, welches innerhalb der amplifizierten Sequenz hybridisiert. Der Vorteil dieser bevorzugten Ausführungsform ist, dass ein einziges Oligonukleotid oder 15 Primerpaar ausreicht, um subtyp- oder/und speziesübergreifend HIV-Viren nachzuweisen.

Statt der Verwendung einer Sonde zum Nachweis des Amplifikationsprodukts können auch beispielsweise DNA-bindende 20 Reagenzien, wie etwa ein DNA-bindender Farbstoff (z.B. Sybergreen) bei der Detektion verwendet werden (WO97/46707).

Gemäß einer weiteren bevorzugten Ausführungsform des Verfahrens der Erfindung werden Oligonukleotidkombinationen oder Primerpaare verwendet, 25 von denen jeweils nur ein Oligonukleotidprimer innerhalb einer der konservierten Regionen liegt, während der andere Primer außerhalb liegt, so daß das so erzeugte Amplifikationsprodukt nur teilweise aus einer Basensequenz aus einer der hochkonservierten Regionen besteht. Der letztere Primer ist bevorzugt subtypspezifisch und/oder speziesspezifisch, 30 so daß mit einer derartigen Kombination Subtypen oder die Spezies gezielt nachgewiesen werden können.

In diesem Fall werden bevorzugt zwei oder mehr Primerpaare als Oligonukleotidkombination verwendet, wobei mindestens zwei Oligonukleotide jeweils mindestens 10 aufeinanderfolgende Nukleotide aus einer Sequenz (i), (ii), (iii) oder dazu komplementären Sequenzen, wie oben beschrieben, enthalten. Die Gesamtheit der Primerkombinationen erlaubt somit einen subtyp- oder/und speziesübergreifenden Nachweis von HI-Viren.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform umfaßt eine für das erfindungsgemäße Verfahren geeignete Oligonukleotidkombination mindestens zwei, bevorzugt drei Oligonukleotide (z.B. ein Primerpaar oder ein Primerpaar plus Sonde), die jeweils mindestens 10 Nukleotide aus

- (i) derselben hochkonservierten Region, des *gag*-Gens oder des *pol*-Gens von HIV, dargestellt durch eine der in SEQ ID NO: 1 bis 13 angegebenen Sequenzen,
- (ii) einer entsprechenden Region eines anderen HI-Virusisolats,
- (iii) einer entsprechenden Region einer aus mehreren HI-Virusisolaten abgeleiteten Konsensussequenz, oder dazu komplementären Sequenzen enthalten.

Bevorzugt werden das mindestens eine und bevorzugt die mindestens zwei Oligonukleotid(e) so ausgewählt, dass sie einen subtypübergreifenden Nachweis von HIV-1 ermöglichen, d.h. dass Nukleinsäuren von mindestens 7 der Subtypen A, B, C, D, E, F, G, H und O von HIV-1, bevorzugt von allen Subtypen erkannt werden.

Bevorzugt werden für den subtypübergreifenden Nachweis mindestens mindestens ein und bevorzugt mindestens zwei Oligonukleotid(e) verwendet, die jeweils mindestens 10 aufeinanderfolgende Nukleotide aus

- (i) einer hochkonservierten Region des LTR, *gag*-Gens oder *pol*-Gens von HIV, dargestellt durch eine der in SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 12 und 13 angegebenen Sequenzen,
- (ii) einer entsprechenden Region eines anderen HI-Virusisolats,

- 14 -

(iii) einer entsprechenden Region einer aus mehreren HI-Virusisolaten stammende Konsensussequenz, oder dazu komplementären Sequenzen enthalten.

5 Bevorzugt werden zum subtyp- oder/und speziesübergreifenden Nachweis von HIV-1 und HIV-2 mindestens ein und bevorzugt mindestens zwei Oligonukleotid(e) verwendet, die jeweils mindestens 10 aufeinanderfolgende Nukleotide aus

10 (i) einer hochkonservierten Region des LTR, *gag*-Gens oder *pol*-Gens von HIV, dargestellt durch eine der in SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 7, 9, 10 und 13 angegebenen Sequenzen,

(ii) einer entsprechenden Region eines anderen HI-Virusisolats,

(iii) einer entsprechenden Region einer aus mehreren HI-Virusisolaten stammenden Konsensussequenz, oder dazu komplementären Sequenzen enthalten.

15 Es hat sich überraschenderweise gezeigt, dass ganz bestimmte Oligonukleotide besonders für das erfindungsgemäße Verfahren geeignet sind. Diese Oligonukleotide sind in den in SEQ ID NO: 14 bis 25 angegebenen Sequenzen dargestellt. Wie bereits eingangs erwähnt, können diese Oligonukleotide aus natürlichen oder synthetischen Nukleinsäurebausteinen bestehen, oder sogar aus der bereits genannten PNA. Bevorzugt trägt mindestens eines der in dem erfindungsgemäßen Verfahren verwendeten Oligonukleotide eine oder mehrere Markierungen. Als Markierungen eignen sich Fluoreszenzmarker oder radioaktive Marker, wie z.B. [³²P]-markierte Nukleotide.

20 Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Oligonukleotid, welches mindestens 10 aufeinanderfolgende Nukleotide aus

25 (i) einer hochkonservierten Region des *pol*-Gens von HIV, dargestellt durch eine der in SEQ ID NO: 4, 5, 9 oder 10 angegebenen Sequenzen,

- 15 -

(ii) einer entsprechenden Region eines anderen HI-Virusisolats,
(iii) einer entsprechenden Region einer aus mehreren HI-Virusisolaten
stammenden Konsensussequenz, oder dazu komplementären
Sequenzen, oder eine der in SEQ ID NO: 14 bis 25 dargestellten
Sequenzen enthält.

5

Bevorzugt umfaßt oder ist das erfindungsgemäße Oligonukleotid eines der
in den SEQ ID NO. 14 bis 25 dargestellten Oligonukleotide. Die Länge des
erfindungsgemäßen Oligonukleotids beträgt bevorzugt 10 bis 80 Nukleotide.

10 Besonders bevorzugt umfasst es ungefähr 20 bis 30 Basen und weist einen
GC-Gehalt von zwischen 40 und 60 % auf. Außerdem ist es vorteilhaft,
wenn die Oligonukleotide keine Selbstkomplementarität am 3'-Ende
aufweisen und darüber hinaus keinen CG-Run am 3'-Ende besitzen. Ein GC-
Run ist eine Basenabfolge, die vorwiegend oder ausschließlich aus den
15 Basen C und G besteht. Weiterhin sollten die Oligonukleotide keine
Palindrome beinhalten. Die erfindungsgemäßen Oligonukleotide weisen
bevorzugt maximal 2 Mismatches zu den entsprechenden mit ihnen
hybridisierenden Sequenzen der gleichen Positionen aller Subtypen auf.
Bevorzugt weist ein erfindungsgemäßes Oligonukleotid an seinem 3'-Ende
20 keine Mismatches mit Nukleotidsäuren der Subtypen A, B, C, D, E, F, G, H
und O von HIV-1 und/oder der Subtypen A, B, C und C von HIV-2 auf.

Bei Primerpaaren werden die Primer jeweils so gewählt, dass die 5'-Enden
der Primer maximal 80 Basen voneinander entfernt positioniert sind,
bezogen auf die Regionen, in denen die Primer auf der nachzuweisenden
25 Nukleinsäure hybridisieren. Besonders bevorzugte Primerpaare sind solche,
bei denen innerhalb dieses von den Primern amplifizierbaren Bereiches eine
weitere HIV-spezifische Sequenz liegt. Diese Sequenz kann dann bevorzugt
verwendet werden, um mit Hilfe einer für sie spezifischen Sonde die
30 Amplifikationsprodukte nachzuweisen. Die erfindungsgemäßen
Oligonukleotide sind bevorzugt mit mindestens einer der oben genannten
Markierungsgruppen versehen.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung ist somit auch eine Kombination von zwei oder mehr Oligonukleotiden, welche beide die oben genannten erfindungsgemäßen Eigenschaften aufweisen und die in ihrer Gesamtheit für den subtyp-und/oder speziesübergreifenden Nachweis von

5 HI-Viren geeignet sind.

Weiterhin umfaßt die Erfindung Kombinationen von Oligonukleotiden. Bevorzugt sind Kombinationen aus mindestens zwei Oligonukleotiden, die jeweils mindestens 10 aufeinander folgende Nukleotide aus

10 (i) derselben hochkonservierten Region der LTR-Region, des *gag*-Gens oder des *pol*-Gens von HIV, dargestellt durch eine der in SEQ ID NO: 1 bis 13 angegebenen Sequenzen,

(ii) einer entsprechenden Region eines anderen HI-Virusisolats,

(iii) einer entsprechenden Region einer aus mehreren HI-Virusisolaten abgeleiteten Konsensussequenz,

15 oder dazu komplementären Sequenzen enthalten.

Noch ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung ist eine Kombination von mehreren Oligonukleotiden, wobei mindestens zwei erfindungsgemäße Oligonukleotide vorliegen, sowie weitere Oligonukleotide, welche jeweils eine für einen einzigen Subtyp von HIV-1 oder/und HIV-2 spezifische Sequenz enthalten, wobei die Gesamtheit der Oligonukleotide in der Oligonukleotidkombination einen subtyp- oder/und speziesübergreifenden Nachweis von HI-Viren erlaubt.

25 Eine weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist die Bereitstellung eines Reagenzienkits, der mindestens ein erfindungsgemäßes Oligonukleotid oder eine erfindungsgemäße Oligonukleotidkombination als Primer oder als Sonden zum Nachweis von HI-Viren oder deren Nukleinsäuren, sowie zur Durchführung einer Hybridisierung und Amplifikation von Nukleinsäuren in einer Probe geeignete Mittel umfasst.

- 17 -

Außerdem betrifft die Erfindung die Verwendung von Oligonukleotiden oder Oligonukleotidkombinationen als Primer oder/und Sonden zum Nachweis von HIV-Viren, insbesondere zum subtyp- und/oder speziesübergreifenden Nachweis.

5

Die nachfolgenden Beispiele sollen die vorliegende Erfindung in veranschaulichender, aber keinesfalls erschöpfender Weise erläutern.

Beispiele

10

Beispiel 1

Sensitivität, Spezifität und dynamischer Messbereich anhand einer HIV-Plasma-Verdünnungsreihe

Zur Untersuchung von Blutproben wurde RNA aus HIV-positivem Plasma mit einer Ausgangskonzentration von 15.000 Genomäquivalenten (geq) HIV pro ml isoliert. Dieses Plasma wurde sukzessive um den Faktor 10 in negativem Plasma verdünnt und nach Probenvorbereitung jeweils in Doppelbestimmungen mit den entsprechenden Primerpaaren amplifiziert. Als Kontrollen dienten ein HIV-negatives Plasma und Wasser. Zur Bestimmung der Spezifität wurde zusätzlich ein HBV- und ein HCV-positives Plasma mitverarbeitet. Nach Amplifikation wurden alle Proben gemessen (ECL-Detektion, Elecsys® 1010).

1. Probenvorbereitung:

25 Zunächst wurden 420 µl Plasma mit 80 µl Proteinase K (25 mg/ml) gemischt und einige Sekunden gevortext. Dann wurden 500 µl Lysepuffer (5,4M Guanidinium-Thiocyanat, 10 mM Harnstoff, 10 mM Tris-HCl, 20 % Triton X100, pH 4,4) hinzugegeben, der 1 µg Carrier-RNA (PolyA/ml) enthielt. Die Mischung wurde gevortext und anschließend für 10 Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt. Dann wurden 500 µl Isopropanol-MGP hinzugegeben (6 mg magnetische Glaspartikel in Isopropanol). Das Gemisch wurde wieder gevortext und anschließend für 20 Minuten bei

Raumtemperatur geschüttelt. Die MGPs wurden mittels Magnetseparation von der Lösung getrennt. Der Überstand wurde abgenommen und verworfen. 750 μ l Waschpuffer (20 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7,5; 70 % Ethanol) wurden hinzugegeben, die MGPs wurden durch Vortexen resuspendiert, und es wurde eine erneute Magnetseparation durchgeführt. Der Waschvorgang wurde insgesamt 5 x wiederholt, und schließlich wurden 100 μ l DEMC-Wasser zur Elution hinzugegeben. Es wurde 15 Minuten bei 80°C geschüttelt und dann eine weitere Magnetseparation durchgeführt. 10 μ l des Eluats wurden für eine RT-PCR eingesetzt.

10

2. Verwendete Primer und Sonden:

In der nachfolgenden Tabelle 1 sind die verwendeten Primer und Sonden dargestellt sowie deren zugehörige hochkonservierte Region, Position im Genom und das mit Primerpaaren hergestellte Amplifikationsprodukt.

15

- 19 -

Tabelle 1

Primer	Hochkonservierte Region	Position	Amplicon
5 SK 462 * SK 431 * SK 102		1359-1388 (30) 1474-1500 (27) 1402-1421 (20)	142 bp
10 RAR 1032 * RAR 1033 * RAR 1034 *		2961-2992 (32) 3097-3129 (33) 2997-3031 (35)	169 bp
15 GH A2F ** (SEQ ID NO. 14) GH A2R ** (SEQ ID NO. 15) GH A2P ** (SEQ ID NO. 16)	SEQ ID NO. 8	4143-4162 (20) 4180-4205 (26) 4162-4179 (18)	63 bp
20 GH A3F ** (SEQ ID NO. 17) GH A3R (SEQ ID NO. 18) GH A3P (SEQ ID NO. 19)	SEQ ID NO. 10	4644-4663 (20) 4677-4702 (26) 4663-4677 (15)	59 bp
25 GH A4F ** (SEQ ID NO. 20) GH A4R ** (SEQ ID NO. 21) GH A4P ** (SEQ ID NO. 22)	SEQ ID NO. 11	4889-4912 (24) 4932-4951 (20) 4913-4931 (19)	63 bp
30 GH A6F ** (SEQ ID NO. 23) GH A6R ** (SEQ ID NO. 24) GH A6P (SEQ ID NO. 25)	SEQ ID NO. 13	4412-4437 (26) 4461-4485 (25) 4438-4460 (23)	74 bp

* Diese Primer sind jeweils publizierte Primer und Sonden von Roche

** Diese Primer sind neue Primer aus der *pol*-Region des HIV-Genoms
entsprechend den in Tabelle 1 genannten hochkonservierten
Bereichen.

3. Amplifikationsmix und Thermocycler-Protokoll für die RT-PCR:
Mastermix:

- 20 -

Reagenzien	Endkonzentration im Mastermix
5x Bicin-Puffer	1 x
MnOAc	2,5 mM
dNTPs (einschließlich dUTP)	200 μ M/600 μ M
5 Vorwärtsprimer	0,3 μ M
Rückwärtsprimer (biotinyliert)	0,3 μ M
Tth-Polymerase	10 Einheiten
UNG	2 Einheiten
10 Gesamtvolumen:	100 μ l

Cycler:

10 Minuten, 37°C: UNG-Dekontaminierung

30 Minuten, 60°C, Reverse Transkription

30 Sekunden, 95 °C: Denaturierung

5 Zyklen 15 Sekunden, 95°C: Denturierung
20 Sekunden, 50°C: Hybridisieren/Elongation

20 30 Zyklen 15 Sekunden, 94°C: Denaturierung

20 Sekunden, 60°C: Hybridisierung/Elongation

7 Minuten, 72°C: endgültige Elongation

Halten bei 50°C

25 4. Detektion:

Die gesamte Detektionsreaktion erfolgte voll automatisiert mit Hilfe eines Elecsys® 1010-Analyse-Automaten.

30 Zunächst wurden 10 μ l Amplifikat und 35 μ l Denaturierungslösung (BM-ID-Nr. 1469053, Boehringer Mannheim) entnommen. In einem Reaktionsgefäß wurde für 5 Minuten bei 37°C inkubiert, und dann wurden 120 μ l

Hybridisierungslösung (BM-ID-Nr. 1469045, Boehringer Mannheim versetzt mit 25 ng/ml Ruthenium-markierter Sonde) hinzugegeben. Es wurde wiederum für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Dann wurden 35 µl einer Elecsys® SA Magnetbeadlösung hinzugegeben (BM-ID-Nr. 1719556, Boehringer Mannheim). Die Lösung wurde für 10 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Elektrochemilumineszenz von 120 µl des Reaktionsgemisches wurde in der Elecsys® 1010-Messzelle gemessen. Zur Hybridisierung wurden die entsprechenden Ruthenium-markierten Sonden laut Tabelle 1 verwendet.

10

5. Ergebnisse

Ergebnis (ECL-counts x 100):

Templat	SK-Primer	RAR-Primer	GH-A2	GH-A3	GH-A4	GH-A6
HIV 15000 Kopien/ml	5763	294	5786	4209	7981	6809
HIV 1500 Kopien/ml	626	38	724	466	899	999
HIV 150 Kopien/ml	184	14	86	164	117	122
HIV 15 Kopien/ml	58	9	13	27	25	10
HIV 1,5 Kopien/ml	49	9	14	32	14	10
HIV-negatives Plasma	70	9	22	38	16	11
HCV-positives Plasma	49	9	5	58	16	10
HBV-positives Plasma	37	9	5	81	17	10
Wasser	12	9	16	35	15	10

15 Die Signale der neuen Primer zeigen gegenüber den Referenzen eine ähnliche Sensitivität. Es erfolgt eine sehr gute Signalabstufung innerhalb der Verdünnungsreihe.

20 Der erhöhte Background bei den Primerpaaren SK und GH-A3 ist vermutlich auf ein nicht optimales Amplifikationsprotokoll zurückzuführen.

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE ANGABEN:

5

(i) ANMELDER:

- (A) NAME: Boehringer Mannheim GmbH
- (B) STRASSE: Sandhofer Strasse 112-132
- (C) ORT: Mannheim-Waldhof
- (D) LAND: DE
- (E) POSTLEITZAHL: 68305

10

(ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Neue Primer und Sonden zum Nachweis von HIV

15

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 25

20

(iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:

- (A) DATENTRÄGER: Floppy disk
- (B) COMPUTER: IBM PC compatible
- (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPA)

25

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 62 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: beides
- (D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

35 AGGGAACCCA CTGCTTAAGC CTCAATAAAG CTTGCCTTGA GTGCTTCAAG TAGTGTGTGC 60

30

CC

62

40

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 62 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: beides
- (D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

50 TTTGACTAGC GGAGGCTAGA AGGAGAGAGA TGGGTGCGAG AGCGTCAGTA TTAAGCGGGG 60

55

GA

62

60

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 62 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: beides
- (D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

65 ATTTTAAAAG CATTGGGACC AGCGGCTACA CTAGAAGAAA TGATGACAGC ATGTCAGGGA 60

GT

62

- 23 -

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 4:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

5 (A) LÄNGE: 54 Basenpaare
 (B) ART: Nucleotid
 (C) STRANGFORM: beides
 (D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

10 CTAAAGGAAG CTCTATTAGA TACAGGAGCA GATGATACAG TATTAGAAGA AATG

54

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 5:

15 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 59 Basenpaare
 (B) ART: Nucleotid
 (C) STRANGFORM: beides
 (D) TOPOLOGIE: linear

20 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:

25 TGGAAACCAA AAATGATAGG GGGATTGGA GGTTTTATCA AAGTAAGACA GTATGATCA

59

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 6:

30 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 65 Basenpaare
 (B) ART: Nucleotid
 (C) STRANGFORM: beides
 (D) TOPOLOGIE: linear

35 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 6:

40 ACTGTACCAAG TAAAATTAAA GCCAGGAATG GATGGCCCAA AAGTTAAACA ATGGCCATTG

60

ACAGA

65

45 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 7:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 53 Basenpaare
 (B) ART: Nucleotid
 (C) STRANGFORM: beides
 (D) TOPOLOGIE: linear

50 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 7:

55 CAATACATGG ATGATTTGTA TGTAGGATCT GACTTAGAAA TAGGGCAGCA TAG

53

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 8:

60 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 77 Basenpaare
 (B) ART: Nucleotid
 (C) STRANGFORM: beides
 (D) TOPOLOGIE: linear

65 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 8:

65 AAGGAAAAGG TCTATCTGGC ATGGGTACCA GCACACAAAG GAATTGGAGG AAATGAACAA

60

70 GTAGATAAAAT TAGTCAG

77

- 24 -

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 9:

5 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 67 Basenpaare
 (B) ART: Nucleotid
 (C) STRANGFORM: beides
 (D) TOPOLOGIE: linear

10 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 9:

AAATAGTAGC CAGCTGTGAT AAATGTCAGC TAAAAGGAGA AGCCATGCAT GGACAAGTAG 60
 ACTGTAG 67

15 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 10:

20 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 59 Basenpaare
 (B) ART: Nucleotid
 (C) STRANGFORM: beides
 (D) TOPOLOGIE: linear

25 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 10:

CAGGAATTTG GAATTCCCTA CAATCCCCAA AGTCAAGGAG TAGTAGAATC TATGAATAA 59

30 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 11:

35 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 101 Basenpaare
 (B) ART: Nucleotid
 (C) STRANGFORM: beides
 (D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 11:

40 AAAATTCAAA ATTTTCGGGT TTATTACAGG GACAGCAGAA ATCCACTTG GAAAGGACCA 60
 GCAAAGCTCC TCTGGAAAGG TGAAGGGCA GTAGTAATAC A 101

45 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 12:

50 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 62 Basenpaare
 (B) ART: Nucleotid
 (C) STRANGFORM: beides
 (D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 12:

55 AGGGATTATG GAAAACAGAT GGCAGGTGAT GATTGTGTGG CAAGTAGACA GGATGAGGAT 60
 TA 62

60 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 13:

65 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 97 Basenpaare
 (B) ART: Nucleotid
 (C) STRANGFORM: beides
 (D) TOPOLOGIE: linear

- 25 -

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 13:

TGGCAACTAG ATTGTACACA TTTAGAAGGA AAAGTTATCC TGGTAGCAGT TCATGTAGCC 60

5 AGTGGATATA TAGAAGCAGA AGTTATTCCA GCAGAAA 97

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 14:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

10 (A) LÄNGE: 20 Basenpaare
 (B) ART: Nucleotid
 (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 (D) TOPOLOGIE: linear

15 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 14:

TACCTGGCAT GGGTACCAAGC

20

20 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 15:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

25 (A) LÄNGE: 26 Basenpaare
 (B) ART: Nucleotid
 (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 (D) TOPOLOGIE: linear

30 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 15:

30 GACTAATTAA TCTACTTGTT CATTTC

26

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 16:

35 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 18 Basenpaare
 (B) ART: Nucleotid
 (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 (D) TOPOLOGIE: linear

40

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 16:

45 CACACAAAGG AATTGGAG

18

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 17:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

50 (A) LÄNGE: 20 Basenpaare
 (B) ART: Nucleotid
 (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 (D) TOPOLOGIE: linear

55 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 17:

55 TTTGGAATTC CCTACAATCC

20

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 18:

60 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 26 Basenpaare
 (B) ART: Nucleotid
 (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 (D) TOPOLOGIE: linear

- 26 -

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 18:

AATTCTTAT TCATAGATTCTACTAC

26

5 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 19:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 15 Basenpaare
(B) ART: Nucleotid
10 (C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 19:

15 CCCAAAGTCA AGGAG

15

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 20:

20 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 24 Basenpaare
(B) ART: Nucleotid
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
25 (D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 20:

TCAAAATTTT CGGGTTTATT ACAG

24

30 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 21:

35 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 20 Basenpaare
(B) ART: Nucleotid
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

40 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 21:

AGCTTTGCTG GTCCCTTCCA

20

45 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 22:

45 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 19 Basenpaare
(B) ART: Nucleotid
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
50 (D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 22:

55 GGACAGCAGA AATCCACTT

19

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 23:

60 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 26 Basenpaare
(B) ART: Nucleotid
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

65

- 27 -

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 23:

GCAACTAGAT TGTACACATT TAGAAG

26

5 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 24:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 25 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- 10 (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 24:

15 CTTCTATATA TCCACTGGCT ACATG

25

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 25:

20 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 23 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

25

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 25:

30 GAAAAGTTAT CCTGGTAGCA GTT

23

Ansprüche

1. Verfahren zum subtyp- und/oder speziesübergreifenden Nachweis von Nukleinsäuren von HI-Viren in einer Probe durch Hybridisierung der Nukleinsäuren mit einer Oligonukleotidkombination, umfassend zwei oder mehr mit HIV-Nukleinsäuren spezifisch hybridisierende Oligonukleotide, die jeweils 10 bis 80 aufeinanderfolgende Nukleotide aus
 - (i) derselben hochkonservierten Region der LTR-Region, des *gag*-Gens oder des *pol*-Gens von HIV, dargestellt durch eine der in SEQ ID NO: 1 bis 13 angegebenen Sequenzen,
 - (ii) einer entsprechenden Region eines anderen HI-Virusisolats,
 - (iii) einer entsprechenden Region einer aus mehreren HI-Virusisolaten abgeleiteten Konsensussequenz, oder dazu komplementären Sequenzen umfassen, und Durchführung eines enzymatischen Amplifikationsschrittes.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es die Schritte umfaßt:
 - (a) Inkontaktbringen einer Probe mit den Oligonukleotiden unter Bedingungen, bei denen eine Hybridisierung der Oligonukleotide mit in der Probe vorhandenen HIV-Nukleinsäuren aus HIV-1 oder/und HIV-2, erfolgt,
 - (b) Bestimmen des Vorhandenseins und/oder der Menge von HIV-Nukleinsäuren in der Probe.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß eine einzige Oligonukleotidkombination verwendet wird.

- 29 -

4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3,
dadurch gekennzeichnet,

daß zum subtypübergreifenden Nachweis die Oligonukleotide so ausgewählt werden, daß mindestens 7 der Subtypen von HIV-1, ausgewählt aus den Subtypen A, B, C, D, E, F, G, H und O mindestens 2 der Subtypen von HIV-2, ausgewählt aus den Subtypen A, B, C und D detektiert werden.

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3,
dadurch gekennzeichnet,

daß zum speziesübergreifenden Nachweis die Oligonukleotide so ausgewählt werden, daß mindestens 7 der Subtypen von HIV-1, ausgewählt aus den Subtypen A, B, C, D, E, F, G, H und O, sowie zusätzlich mindestens einer der Subtypen von HIV-2, ausgewählt aus den Subtypen A, B, C und D detektiert werden.

6. Verfahren zum subtyp- und/oder speziesübergreifenden Nachweis von Nukleinsäuren von HI-Viren in einer Probe durch Hybridisierung der Nukleinsäuren mit zwei oder mehr Oligonukleotidkombinationen, jede Oligonukleotidkombination umfassend ein erstes Oligonukleotid, das 10 bis 80 aufeinanderfolgende Nukleotide

- (i) einer hochkonservierten Region der LTR-Region, des *gag*-Gens oder des *pol*-Gens von HIV, dargestellt durch eine der in SEQ ID NO: 1 bis 13 angegebenen Sequenzen,
- (ii) einer entsprechenden Region eines anderen HI-Virusisolats,
- (iii) einer entsprechenden Region einer aus mehreren HI-Virusisolaten abgeleiteten Konsensussequenz,

oder dazu komplementären Sequenzen umfaßt, und ein zweites Oligonukleotid, das eine subtyp- und/oder speziespezifische Hybridisierung mit HIV-Nukleinsäuren ermöglicht, und Durchführen eines enzymatischen Amplifikationsschrittes,

- 30 -

wobei die Gesamtheit der Oligonukleotidkombinationen einen subtyp- und/oder speziesübergreifenden Nachweis von HI-Viren erlaubt.

7. Verfahren nach Anspruch 6,

dadurch gekennzeichnet,

daß zum subtypübergreifenen Nachweis die Oligonukleotide so ausgewählt werden, daß mindestens 7 der Subtypen von HIV-1, ausgewählt aus den Subtypen A, B, C, D, E, F, G, H und O mindestens 2 der Subtypen von HIV-2, ausgewählt aus den Subtypen

A, B, C und D detektiert werden.

8. Verfahren nach Anspruch 7,

dadurch gekennzeichnet,

daß zum Nachweis mindestens zwei Oligonukleotide verwendet werden, die jeweils 10 bis 80 aufeinanderfolgende Nukleotide aus.

(i) einer hochkonservierten Region des LTR, *gag*-Gens oder *pol*-Gens von HIV, dargestellt durch eine der in SEQ ID NO: 2, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 12 und 13 angegebenen Sequenzen,

(ii) einer entsprechenden Region eines anderen HI-Virusisolats,

(iii) einer entsprechenden Region einer aus mehreren HI-Virusisolaten stammende Konsensussequenz, oder dazu komplementären Sequenzen umfassen.

9. Verfahren nach Anspruch 6,

dadurch gekennzeichnet,

daß zum speziesübergreifenden Nachweis die Oligonukleotide so ausgewählt werden, daß mindestens 7 der Subtypen von HIV-1, ausgewählt aus den Subtypen A, B, C, D, E, F, G, H und O, sowie zusätzlich mindestens einer der Subtypen von HIV-2, ausgewählt aus den Subtypen A, B, C und D detektiert werden.

10. Verfahren nach Anspruch 9,
dadurch gekennzeichnet,
daß zum Nachweis mindestens zwei Oligonukleotide verwendet werden, die jeweils 10 bis 80 aufeinanderfolgende Nukleotide aus
5 (i) einer hochkonservierten Region des LTR, *gag*-Gens oder *pol*-Gens von HIV, dargestellt durch eine der in SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 7, 9, 10 und 13 angegebenen Sequenzen,
(ii) einer entsprechenden Region eines anderen HI-Virusisolats,
(iii) einer entsprechenden Region einer aus mehreren HI-
10 Virusisolaten stammenden Konsensussequenz,
oder dazu komplementären Sequenzen umfassen.

11. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Oligonukleotide die in SEQ ID NO. 14 bis 25 angegebenen Sequenzen aufweisen oder enthalten.
15

12. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
daß mindestens ein Oligonukleotid eine oder mehrere Markierungen
20 aufweist.

13. Oligonukleotid,
dadurch gekennzeichnet,
daß es 10 bis 80 aufeinanderfolgende Nukleotide aus
25 (i) einer hochkonservierten Region des *pol*-Gens von HIV, dargestellt durch eine der in SEQ ID NO: 4, 5, 9 oder 10 angegebenen Sequenzen,
(ii) einer entsprechenden Region eines anderen HI-Virusisolats,
30 (iii) einer entsprechenden Region einer aus mehreren HI-Virusisolaten stammenden Konsensussequenz,
oder dazu komplementären Sequenzen umfaßt,

mit der Maßgabe, daß es nicht die Nukleotidsequenz
CTACTACTCC TTGACTTTGG GGATTG
oder deren Komplementärsequenz umfaßt.

- 5 14. Oligonukleotid nach Anspruch 13,
dadurch gekennzeichnet,
daß es 10 bis 80 aufeinanderfolgende Nukleotide aus
(i) einer hochkonservierten Region des *pol*-Gens von HIV,
dargestellt durch eine der in SEQ ID NO: 4, 5 oder 9
angegebenen Sequenzen,
(ii) einer entsprechenden Region eines anderen HI-Virusisolats,
(iii) einer entsprechenden Region einer aus mehreren HI-
Virusisolaten stammenden Konsensussequenz,
oder dazu komplementären Sequenzen umfaßt.
- 15 15. Oligonukleotid,
dadurch gekennzeichnet,
daß es mindestens eine der in SEQ ID NO. 14, 16, 17, 18, 20, 22,
23, 24 und 25 dargestellten Sequenzen umfaßt.
- 20 16. Oligonukleotid nach einem der Ansprüche 13 bis 15,
dadurch gekennzeichnet,
daß es an seinem 3'-Ende keine Mismatches mit Nukleinsäuren der
Subtypen A, B, C, D, E, F, G, H und O von HIV-1 und der Subtypen
A, B, C und D von HIV-2 aufweist.
- 25 17. Oligonukleotid nach einem der Ansprüche 13 bis 16,
dadurch gekennzeichnet,
daß es eine oder mehrere Markierungen aufweist.
- 30 18. Kombination von mehreren Oligonukleotiden, umfassend mindestens
zwei Oligonukleotide,

dadurch gekennzeichnet,

daß die mindestens zwei Oligonukleotide jeweils 10 bis 80 aufeinanderfolgende Nukleotide aus

(i) derselben hochkonservierten Region der LTR-Region, des *gag*-Gens oder des *pol*-Gens von HIV, dargestellt durch eine der in SEQ ID NO: 1 bis 13 angegebenen Sequenzen,

(ii) einer entsprechenden Region eines anderen HI-Virusisolats,

(iii) einer entsprechenden Region einer aus mehreren HI-Virusisolaten abgeleiteten Konsensussequenz,

oder dazu komplementären Sequenzen umfassen und die Kombination so ausgewählt ist, daß sie eine enzymatische Amplifikation erlaubt.

19. Kombination von mehreren Oligonukleotiden, umfassend mindestens

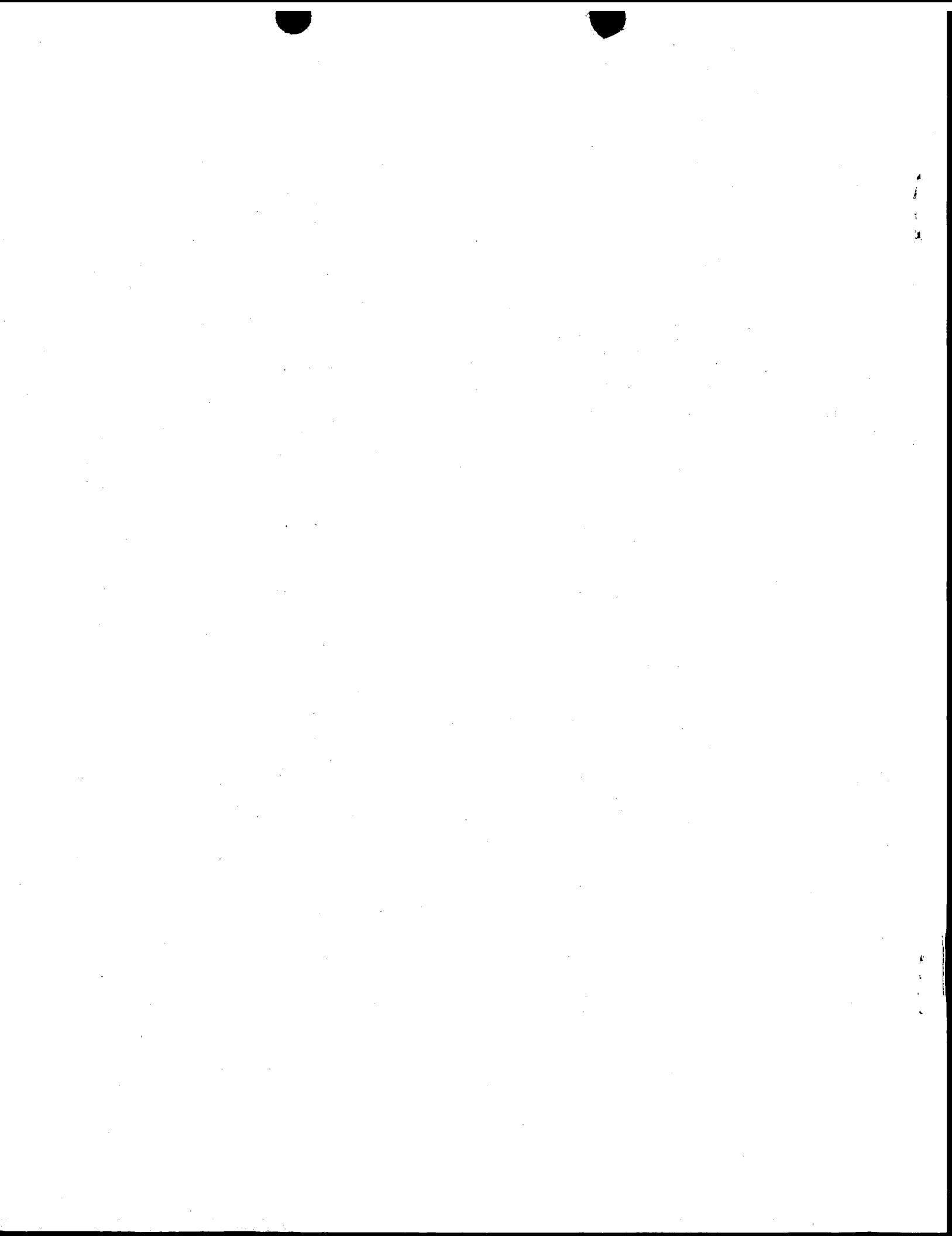
zwei Oligonukleotide, ausgewählt aus den Oligonukleotiden nach einem der Ansprüche 13 bis 17, und gegebenenfalls weitere Oligonukleotide, welche jeweils eine für einen einzigen Subtyp von HIV-1 und/oder HIV-2 spezifische Sequenz enthalten, wobei die Gesamtheit der Oligonukleotide einen subtyp- und/oder speziesübergreifenden Nachweis von HI-Viren erlaubt.

20. Reagenzienkit umfassend ein Oligonukleotid nach einem der

Ansprüche 13 bis 17 oder eine Oligonukleotidkombination nach Anspruch 18 oder 19 als Primer und/oder Sonden zum Nachweis von HI-Viren oder deren Nukleinsäuren, sowie zur Durchführung einer Hybridisierung und Amplifikation von Nukleinsäuren in einer Probe geeignete Mittel.

21. Verwendung von Oligonukleotiden oder Oligonukleotidkombinationen

nach einem der Ansprüche 13 bis 19 als Primer und/oder Sonden zum subtyp- und/oder speziesübergreifenden Nachweis von HI-Viren.





PCT

ORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM Internationales Büro

INTERNATIONALES BÜRO

INTERNATIONALES BÜRO
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁷ : C12Q 1/70		A3	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/29611 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 25. Mai 2000 (25.05.00)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP99/08211 (22) Internationales Anmeldedatum: 29. Oktober 1999 (29.10.99)		(81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).	
(30) Prioritätsdaten: 198 50 186.2 30. Oktober 1998 (30.10.98) DE		Veröffentlicht Mit internationalem Recherchenbericht.	
(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): ROCHE DIAGNOSTICS GMBH [DE/DE]; Sandhofer Strasse 112 – 132, D-68305 Mannheim (DE).		(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenberichts: 26. Oktober 2000 (26.10.00)	
(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): HABERHAUSEN, Gerd [DE/DE]; Jochbergweg 2, D-82393 Iffeldorf (DE). KASPER, Pia [DE/DE]; Sandhofer Strasse 13 a, D-68305 Mannheim (DE). KESSLER, Christoph [DE/DE]; Schlossbergweg 11, D-82057 Icking (DE).			
(74) Anwälte: WEICKMANN, H. usw.; Kopernikusstrasse 9, D-81679 München (DE).			

(54) Title: NOVEL PRIMERS AND PROBES FOR DETECTING HIV

(54) Bezeichnung: NEUE PRIMER UND SONDEN ZUM NACHWEIS VON HIV

(57) Abstract

The invention relates to a method for the subtype and/or species-comprehensive detection of HI viruses in a sample while using at least one oligonucleotide which contains at least 10 successive nucleotides from (i) a highly preserved region of the LTR region, of the *gag* gene or of the *pol* gene of HIV, (ii) of a corresponding region of another HI virus isolate, (iii) of a corresponding region of a consensus sequence stemming from a plurality of HI virus isolates or of sequences complementary thereto.

(57) Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum subtyp- und/oder speziesübergreifenden Nachweis von HI-Viren in einer Probe unter Verwendung mindestens eines Oligonukleotids, welches mindestens 10 aufeinanderfolgende Nukleotide aus (i) einer hochkonservierten Region der LTR-Region, des *gag*-Gens oder des *pol*-Gens von HIV, (ii) einer entsprechenden Region eines anderen HI-Virusisolats, (iii) einer entsprechenden Region einer aus mehreren HI-Virusisolaten stammenden Konsensussequenz, oder dazu komplementären Sequenzen enthält.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänen		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 99/08211

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C12Q1/70

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

STRAND

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 0 854 197 A (HOFFMANN LA ROCHE) 22 July 1998 (1998-07-22) page 2, line 32 – line 53 page 4, line 1 – line 48	1-10, 18-21
X	EP 0 727 497 A (HOFFMANN LA ROCHE) 21 August 1996 (1996-08-21) cited in the application page 1, line 24 – line 31 page 4, line 31 – page 5, line 19	1-10, 18-21
X	EP 0 617 132 A (GEN PROBE INC) 28 September 1994 (1994-09-28) cited in the application page 3, line 9 – line 16	1-10, 18-21
	-/-	

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

17 July 2000

Date of mailing of the international search report

07/08/2000

Name and mailing address of the ISA
European Patent Office, P.B. 5818 Patentiaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Osborne, H

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 99/08211

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 0 516 540 A (CIS BIO INT) 2 December 1992 (1992-12-02) page 3, line 9 - line 48; claims 1-4 —	1-10, 18-21
X	EP 0 839 917 A (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH) 6 May 1998 (1998-05-06) cited in the application page 4, line 7 - line 14 —	1-10, 18-21
X	EP 0 806 484 A (PASTEUR INSTITUT ;INST NAT SANTE RECH MED (FR)) 12 November 1997 (1997-11-12) page 4-6 —	1-10, 18-21
P,X	EP 0 887 427 A (ORTHO CLINICAL DIAGNOSTICS INC) 30 December 1998 (1998-12-30) cited in the application page 9, line 28 - line 46 —	1-10, 18-21
P,X	WO 98 58086 A (ABBOTT LAB) 23 December 1998 (1998-12-23) page 11, line 21 -page 22 —	1-10, 18-21
P,X	WO 99 07898 A (JURRIAANS SUZANNE ;AKZO NOBEL NV (NL); GOUDSMIT JAAP (NL); LUKASHO) 18 February 1999 (1999-02-18) cited in the application the whole document —	1-10, 18-21
X	WO 98 44945 A (IMMUNE RESPONSE CORP INC) 15 October 1998 (1998-10-15) Application SEQ ID NO 4 has 100% identity in 36 bp overlap with SEQ ID NO 1 —	13
X	EMBL Database Entry AGPROTF3, Accession number M24551, 6 July 1989: Louis Jim et al.: Human immunodeficiency virus (HIV-1) synthetic protease XP002142699 Application SEQ ID NO 5 has 100% identity in 58 bp overlap with AGPROTF3. —	13
X	EP 0 229 701 A (CETUS CORP) 22 July 1987 (1987-07-22) Application SEQ ID NO 9 has 100% identity in 41 bp overlap with sequence Sk 34, page 14, line 18. —	13
X	WO 92 15708 A (AMOCO CORP) 17 September 1992 (1992-09-17) Application SEQ ID NO 10 has 100% identity in 31 bp overlap with SEQ 839 of Table 1. —	13

-/-

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Interr. Application No

PCT/EP 99/08211

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 95 21912 A (LEARMONT JENNIFER CATHERINE ; CROWE SUZANNE (AU); COOPER DAVID (AU)) 17 August 1995 (1995-08-17) Application SEQ ID NO 17 has 100% identity in 17 bp overlap with SEQ ID NO 623 -----	15
X	WO 96 02557 A (GEN PROBE INC) 1 February 1996 (1996-02-01) Application SEQ ID NO 16 and NO 14 have 100% identity in 18 bp overlap with SEQ ID NO 2, and in 14 bp with SEQ ID NO 1 respectively. -----	15
A	DE BAAR M ET AL: "Design and evaluation of a Human Immunodeficiency Virus Type 1." JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, vol. 37, no. 6, - June 1999 (1999-06) pages 1813-18, XP000923207 -----	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/EP 99/08211

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
EP 0854197	A 22-07-1998	AU 693066 A BR 9800337 A CA 2222769 A CN 1191975 A CZ 9800149 A HU 9800053 A JP 2838084 B JP 10210990 A NO 980212 A PL 324327 A US 5908743 A		18-06-1998 29-06-1999 17-07-1998 02-09-1998 12-08-1998 28-08-1998 16-12-1998 11-08-1998 20-07-1998 20-07-1998 01-06-1999
EP 0727497	A 21-08-1996	US 5599662 A CA 2169315 A JP 8242898 A		04-02-1997 18-08-1996 24-09-1996
EP 0617132	A 28-09-1994	AU 686616 B AU 6551594 A CA 2159103 A JP 8508404 T WO 9423069 A US 5856088 A US 5712385 A		12-02-1998 24-10-1994 13-10-1994 10-09-1996 13-10-1994 05-01-1999 27-01-1998
EP 0516540	A 02-12-1992	FR 2677039 A DE 69217122 D		04-12-1992 13-03-1997
EP 0839917	A 06-05-1998	DE 19644248 A JP 10117780 A US 5985544 A		30-04-1998 12-05-1998 16-11-1999
EP 0806484	A 12-11-1997	FR 2647809 A FR 2652091 A AT 185379 T CA 2062829 A DE 69033311 D DE 69033311 T EP 0403333 A ES 2139567 T WO 9015066 A JP 2000093187 A JP 4507043 T SG 47868 A US 5688637 A US 5786177 A		07-12-1990 22-03-1991 15-10-1999 03-12-1990 11-11-1999 17-02-2000 19-12-1990 16-02-2000 13-12-1990 04-04-2000 10-12-1992 17-04-1998 18-11-1997 28-07-1998
EP 0887427	A 30-12-1998	JP 11069987 A US 6001558 A		16-03-1999 14-12-1999
WO 9858086	A 23-12-1998	US 5962665 A EP 0991782 A		05-10-1999 12-04-2000
WO 9907898	A 18-02-1999	AU 9161198 A EP 1002138 A ZA 9807091 A		01-03-1999 24-05-2000 26-02-1999
WO 9844945	A 15-10-1998	AU 7101798 A		30-10-1998

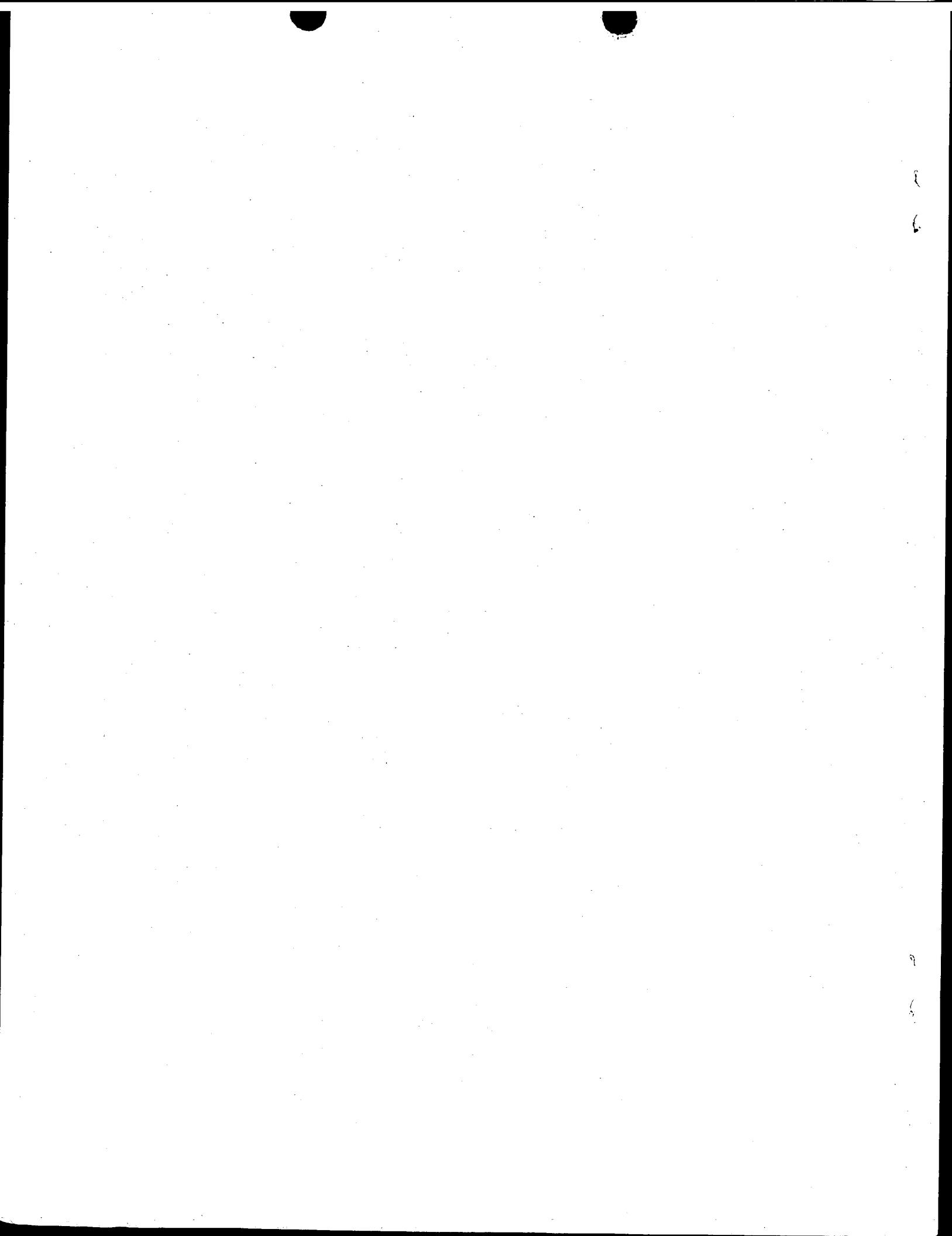
INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 99/08211

Patent document cited in search report		Publication date		Patent family member(s)	Publication date
EP 0229701	A	22-07-1987		AT 127857 T AU 606043 B AU 6710987 A CA 1279244 A DE 3751513 D DE 3751513 T DK 10787 A ES 2078214 T IE 69565 B JP 2576980 B JP 62217161 A JP 2574640 B JP 6233700 A KR 9104250 B NZ 218865 A US 5386022 A US 5594123 A US 5176995 A US 5008182 A ZA 8700152 A	15-09-1995 31-01-1991 16-07-1987 22-01-1991 19-10-1995 28-03-1996 11-07-1987 16-12-1995 02-10-1996 29-01-1997 24-09-1987 22-01-1997 23-08-1994 24-06-1991 29-05-1989 31-01-1995 14-01-1997 05-01-1993 16-04-1991 28-09-1988
WO 9215708	A	17-09-1992		EP 0529070 A US 5702896 A	03-03-1993 30-12-1997
WO 9521912	A	17-08-1995		US 6010895 A AU 699175 B AU 1700895 A CA 2183154 A EP 0754223 A JP 10500281 T US 6015661 A ZA 9501182 A	04-01-2000 26-11-1998 29-08-1995 17-08-1995 22-01-1997 13-01-1998 18-01-2000 18-10-1995
WO 9602557	A	01-02-1996		US 5733781 A AU 699233 B AU 3135495 A CA 2194398 A EP 0697414 A JP 10501421 T	31-03-1998 26-11-1998 16-02-1996 01-02-1996 21-02-1996 10-02-1998



INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/08211

A. KLASSEFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C12Q1/70

Nach der internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12Q

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

STRAND

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie ^a	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	EP 0 854 197 A (HOFFMANN LA ROCHE) 22. Juli 1998 (1998-07-22) Seite 2, Zeile 32 – Zeile 53 Seite 4, Zeile 1 – Zeile 48	1-10, 18-21
X	EP 0 727 497 A (HOFFMANN LA ROCHE) 21. August 1996 (1996-08-21) in der Anmeldung erwähnt Seite 1, Zeile 24 – Zeile 31 Seite 4, Zeile 31 – Seite 5, Zeile 19	1-10, 18-21
X	EP 0 617 132 A (GEN PROBE INC) 28. September 1994 (1994-09-28) in der Anmeldung erwähnt Seite 3, Zeile 9 – Zeile 16	1-10, 18-21

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

^a Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen:

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfindender Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfindender Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

17. Juli 2000

07/08/2000

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Osborne, H

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Interne Aktenzeichen
PCT/EP 99/08211

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	EP 0 516 540 A (CIS BIO INT) 2. Dezember 1992 (1992-12-02) Seite 3, Zeile 9 - Zeile 48; Ansprüche 1-4 ---	1-10, 18-21
X	EP 0 839 917 A (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH) 6. Mai 1998 (1998-05-06) in der Anmeldung erwähnt Seite 4, Zeile 7 - Zeile 14 ---	1-10, 18-21
X	EP 0 806 484 A (PASTEUR INSTITUT ; INST NAT SANTE RECH MED (FR)) 12. November 1997 (1997-11-12) Seite 4-6 ---	1-10, 18-21
P,X	EP 0 887 427 A (ORTHO CLINICAL DIAGNOSTICS INC) 30. Dezember 1998 (1998-12-30) in der Anmeldung erwähnt Seite 9, Zeile 28 - Zeile 46 ---	1-10, 18-21
P,X	WO 98 58086 A (ABBOTT LAB) 23. Dezember 1998 (1998-12-23) Seite 11, Zeile 21 -Seite 22 ---	1-10, 18-21
P,X	WO 99 07898 A (JURRIAANS SUZANNE ; AKZO NOBEL NV (NL); GOUDSMIT JAAP (NL); LUKASHO) 18. Februar 1999 (1999-02-18) in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument ---	1-10, 18-21
X	WO 98 44945 A (IMMUNE RESPONSE CORP INC) 15. Oktober 1998 (1998-10-15) Application SEQ ID NO 4 has 100% identity in 36 bp overlap with SEQ ID NO 1 ---	13
X	EMBL Database Entry AGPROTF3, Accession number M24551, 6 July 1989: Louis jm et al.: Human immunodeficiency virus (HIV-1) synthetic protease XP002142699 Application SEQ ID NO 5 has 100% identity in 58 bp overlap with AGPROTF3. ---	13
X	EP 0 229 701 A (CETUS CORP) 22. Juli 1987 (1987-07-22) Application SEQ ID NO 9 has 100% identity in 41 bp overlap with sequence Sk 34, page 14, line 18. ---	13
X	WO 92 15708 A (AMOCO CORP) 17. September 1992 (1992-09-17) Application SEQ ID NO 10 has 100% identity in 31 bp overlap with SEQ 839 of Table 1. ---	13
		-/-

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/08211

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 95 21912 A (LEARMONT JENNIFER CATHERINE ; CROWE SUZANNE (AU); COOPER DAVID (AU)) 17. August 1995 (1995-08-17) Application SEQ ID NO 17 has 100% identity in 17 bp overlap with SEQ ID NO 623	15
X	WO 96 02557 A (GEN PROBE INC) 1. Februar 1996 (1996-02-01) Application SEQ ID NO 16 and NO 14 have 100% identity in 18 bp overlap with SEQ ID NO 2, and in 14 bp with SEQ ID NO 1 respectively.	15
A	DE BAAR M ET AL: "Design and evaluation of a Human Immunodeficiency Virus Type 1." JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, Bd. 37, Nr. 6, - Juni 1999 (1999-06) Seiten 1813-18, XP000923207	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/08211

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP 0854197 A	22-07-1998	AU 693066 A BR 9800337 A CA 2222769 A CN 1191975 A CZ 9800149 A HU 9800053 A JP 2838084 B JP 10210990 A NO 980212 A PL 324327 A US 5908743 A	18-06-1998 29-06-1999 17-07-1998 02-09-1998 12-08-1998 28-08-1998 16-12-1998 11-08-1998 20-07-1998 20-07-1998 01-06-1999
EP 0727497 A	21-08-1996	US 5599662 A CA 2169315 A JP 8242898 A	04-02-1997 18-08-1996 24-09-1996
EP 0617132 A	28-09-1994	AU 686616 B AU 6551594 A CA 2159103 A JP 8508404 T WO 9423069 A US 5856088 A US 5712385 A	12-02-1998 24-10-1994 13-10-1994 10-09-1996 13-10-1994 05-01-1999 27-01-1998
EP 0516540 A	02-12-1992	FR 2677039 A DE 69217122 D	04-12-1992 13-03-1997
EP 0839917 A	06-05-1998	DE 19644248 A JP 10117780 A US 5985544 A	30-04-1998 12-05-1998 16-11-1999
EP 0806484 A	12-11-1997	FR 2647809 A FR 2652091 A AT 185379 T CA 2062829 A DE 69033311 D DE 69033311 T EP 0403333 A ES 2139567 T WO 9015066 A JP 2000093187 A JP 4507043 T SG 47868 A US 5688637 A US 5786177 A	07-12-1990 22-03-1991 15-10-1999 03-12-1990 11-11-1999 17-02-2000 19-12-1990 16-02-2000 13-12-1990 04-04-2000 10-12-1992 17-04-1998 18-11-1997 28-07-1998
EP 0887427 A	30-12-1998	JP 11069987 A US 6001558 A	16-03-1999 14-12-1999
WO 9858086 A	23-12-1998	US 5962665 A EP 0991782 A	05-10-1999 12-04-2000
WO 9907898 A	18-02-1999	AU 9161198 A EP 1002138 A ZA 9807091 A	01-03-1999 24-05-2000 26-02-1999
WO 9844945 A	15-10-1998	AU 7101798 A	30-10-1998

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/08211

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
EP 0229701	A	22-07-1987	AT	127857 T	15-09-1995
			AU	606043 B	31-01-1991
			AU	6710987 A	16-07-1987
			CA	1279244 A	22-01-1991
			DE	3751513 D	19-10-1995
			DE	3751513 T	28-03-1996
			DK	10787 A	11-07-1987
			ES	2078214 T	16-12-1995
			IE	69565 B	02-10-1996
			JP	2576980 B	29-01-1997
			JP	62217161 A	24-09-1987
			JP	2574640 B	22-01-1997
			JP	6233700 A	23-08-1994
			KR	9104250 B	24-06-1991
			NZ	218865 A	29-05-1989
			US	5386022 A	31-01-1995
			US	5594123 A	14-01-1997
			US	5176995 A	05-01-1993
			US	5008182 A	16-04-1991
			ZA	8700152 A	28-09-1988
WO 9215708	A	17-09-1992	EP	0529070 A	03-03-1993
			US	5702896 A	30-12-1997
WO 9521912	A	17-08-1995	US	6010895 A	04-01-2000
			AU	699175 B	26-11-1998
			AU	1700895 A	29-08-1995
			CA	2183154 A	17-08-1995
			EP	0754223 A	22-01-1997
			JP	10500281 T	13-01-1998
			US	6015661 A	18-01-2000
			ZA	9501182 A	18-10-1995
WO 9602557	A	01-02-1996	US	5733781 A	31-03-1998
			AU	699233 B	26-11-1998
			AU	3135495 A	16-02-1996
			CA	2194398 A	01-02-1996
			EP	0697414 A	21-02-1996
			JP	10501421 T	10-02-1998

